

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

OLÁVIO CAMPOS JÚNIOR

**EFEITO DO MATERIAL PARTICULADO SOBRE A ESPERMATOGÊNESE DE
RATOS SUBMETIDOS AO PROCESSO DE NEBULIZAÇÃO COM PÓ DE DIESEL**

RECIFE, 2013

OLÁVIO CAMPOS JÚNIOR

**EFEITO DO MATERIAL PARTICULADO SOBRE A ESPERMATOGÊNESE DE
RATOS SUBMETIDOS AO PROCESSO DE NEBULIZAÇÃO COM PÓ DE DIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, nível
Mestrado, para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Maria das Graças
Carneiro da Cunha.

Co-orientadora: Prof. Dra. Elizabeth Neves
de Melo

RECIFE, 2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Campos Júnior, Olávio

Efeito do material particulado sobre a espermatogênese de ratos submetidos ao processo de nebulização com pó de diesel. / Recife: O Autor, 2013.

68 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria das Graças Carneiro Cunha

Coorientadora: Elizabeth Neves de Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2013.

Inclui referências e anexos

- 1. Espermatogênese em animais 2. Ar- poluição 3. Diesel I. Cunha, Maria das Graças Carneiro (orient.) II. Melo, Elizabeth Neves de (coorient.) III. Título**

571.845

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 482

OLÁVIO CAMPOS JÚNIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, nível Mestrado, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 25 / 02 /2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha/ UFPE

Prof. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia/UFPE

Prof. Dra. Elizabeth Neves de Melo/ UFPE

Dedico ao meu grande amigo e pai que continua sua existência em nossos corações, à minha mãe, minha irmã, minha esposa e a minha filha que estará conosco em breve.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas horas de auxílio e despertar no caminho da instrução e do trabalho.

À minha família: Cícera Maria, Giselly Campos, Ticiane Navarro, Isadora Navarro e meu pai Olávio Campos por todo amor e apoio. Amo vocês.

Às professoras Maria das Graças Carneiro da Cunha e Elizabeth Neves de Melo pela valiosa orientação, paciência e pela grande oportunidade que me deram.

À professora Maria Tereza dos Santos Correia pelo apoio financeiro, incentivo moral e pela grande oportunidade que me deu junto ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas.

À todas as pessoas que compõem o Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas pela disponibilidade em ajudar-nos, principalmente à Adenilda Eugênia que sempre está disposta a ajudar-nos com a sua forma especial de atenção e carinho.

Aos Professores Paulo Saldiva, Adriana Pires e Roberta Carvalho do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da USP pelo fornecimento do material particulado utilizado.

Aos amigos e companheiros de laboratório que contribuíram tanto para a execução desse trabalho além de todo companheirismo: Alessandra Maciel, Priscila Mirelly, Milena Silva, José Neto, Breno Oliveira, Silvia Neves, Fernanda Dias, Ticiane Navarro, Alluanan Adelson e Jessica Santana, Werlayne Mendes e Robson Coelho. Vocês foram parte fundamental desse trabalho.

Aos Docentes da pós-graduação em Ciências Biológicas pela competência e contribuição para o nosso crescimento intelectual.

A todos os amigos do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, em especial a Anniele Mendes pela valiosa amizade que construímos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho além das sutis e imateriais contribuições para nosso crescimento. Serei eternamente grato.

**“Somos todos visitantes deste tempo, deste lugar. Estamos só de passagem.
O nosso objetivo é observar, crescer, amar...
E depois vamos para casa.”**

Provérbio aborígene.

RESUMO

Partículas de exaustão do diesel (PED) contribuem substancialmente para a toxicidade crônica e aguda do material particulado inalado. A exposição a poluentes está relacionada com o aumento da ocorrência de distúrbios reprodutivos como redução da espermatogênese. Desta forma, o presente trabalho objetivou caracterizar o efeito da exposição às PED por meio do processo de nebulização sobre a espermatogênese de ratos Wistar adultos através de análises morfológicas e histomorfométricas dos testículos. Vinte ratos Wistar adultos com 105 dias de idade foram divididos em dois grupos (n=10): GT – Grupo teste exposto às partículas da exaustão do diesel; e GC – grupo controle. A exposição foi realizada por meio de dispositivo de nebulização pneumática, durante 90 dias e após a última exposição os animais foram anestesiados, eutanasiados e orquiectomizados. Os testículos foram pesados e fixados com solução Bouin, corados com Hematoxilina-Eosina e analisados por microscopia de luz. Os resultados mostraram que os animais do GT apresentaram redução no peso testicular de 8,8% e no peso corporal 6,2% com manutenção do índice gonadossomático. A proporção volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular não foi afetada. Entretanto, o aumento de 4,7% da razão túbulo-epitélio no GT sugere comprometimento da função epitelial do túbulo seminífero. Os comprimentos do túbulo seminífero por testículo e o por grama de testículo diminuíram 54,0% e 50,0% respectivamente, comparados ao GC. As populações celulares por seção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 com base no método morfológico apresentaram um aumento de 13,4% no número corrigido de espermátides arredondadas como para as células de Sertoli. A população de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo mostrou uma redução significativa de 58,4% e 54,2%, respectivamente. As frequências dos estádios 2, 3, 5 e 6 do ciclo do epitélio seminífero foram diferentes no GT. A produção espermática diária PED por grama de testículo aumentou 56,8% enquanto a PED por testículo foi de 60,7% menor nos animais expostos cronicamente às partículas da exaustão do diesel. Frente a esses resultados constata-se que a exposição às DEP na concentração média estabelecida pela Organização Mundial da Saúde está associada com o comprometimento da produção diária de espermatozoides em ratos na idade adulta. Além do mais, os dados biométricos, morfológicos e estereológicos indicam que as DEP podem estar envolvidas em mecanismos que ativam mudanças na normalidade estrutural e funcional testicular de ratos expostos.

Palavras-chaves: Espermatogênese. Poluição do ar. Material particulado

ABSTRACT

Diesel exhaust particles (DEP) contribute substantially to chronic and acute toxicity of inhaled particulate matter. Studies have investigated the possibility that exposure to pollutants may increase reproductive disorders such as spermatogenesis reduction. The present study aimed to characterize the DEP exposure effect on seminiferous tubule and spermatogenesis of adult rats through the nebulization process by morphological and histomorphometric testis analyses. Twenty adult Wistar rats 105 days of age were randomly divided into two groups (n = 10): GT – Tested group exposed to DEP and CG – non-exposed group. The animal exposure was performed using pneumatic nebulization device for 90 consecutive days. Twenty-four hours after the last treatment animals were anesthetized, euthanized and orchiectomized. The testis were weighed and fixed in Bouin solution and stained with Hematoxylin - Eosin and analyzed by light microscopy. In the GT animals presented decreased testicular weight of 8.8% and testicular weight of 6.2% while the gonadosomatic index did not change. The volume density of tubular and intertubular compartments were not affected by exposure. However, significant increase of 4.7% in the tubule-epithelium ratio in GT suggests impairment of the compromised seminiferous epithelial function. The seminiferous tubule length per testis and the seminiferous tubule length per gram of testis significantly smaller 54.0% and 50.0% than the GC, respectively. Seminiferous epithelium cells number per seminiferous tubule cross section at based on morphological method showed increase of 3.4% in round spermatids and Sertoli cells. The Sertoli cells population per testis and per gram of testicular tissue showed reduction of 58.4% and 54.2% respectively. Frequency of stages 2, 3, 5 and 6 seminiferous tubules were different in GT group. The daily sperm production per gram of testicular tissue was higher 56.8% while the sperm production per testis was lower 60.7% in animals chronically exposed to diesel exhaust. These results indicate that exposure to DEP at levels in similar mean concentration established by the World Health Organization were associated with impairment of daily sperm production in adulthood rats. Furthermore, the biometric, morphological and stereological data indicate that DEP may be involved in the mechanisms that activate changes in normal mechanisms of testis structure and function of exposed rats testis.

Keywords: Spermatogenesis. air pollution. particulate matter

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Esquema da distribuição do material particulado pelo diâmetro aerodinâmico da partícula de acordo com a massa ponderada e número ponderado (adaptado de KITTELSON, 1998)..... 16

FIGURA 2: Esquema representativo dos Compartimentos do Túbulo Seminífero: SG: espermatogônias; pSC: Espermatócito primários; rST: Espermátides Arredondadas; eST: espermátides alongadas e Célula de Sertoli e Compartimento Intersticial: LC: Célula de Leydig; M: Macrófagos e BV: Vasos Sanguíneos (adaptado de SCHLATT, 1997) 18

FIGURA 3: Montagem fotográfica dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero em jaguatirica (*Leopardus pardalis*). Espermatogônia (SPTG); espermatogônia A (SPTGA); espermatogônia B (SPTGB); célula de Sertoli (S); espermatócito em pré-leptóteno/ leptóteno (PL/L); leptóteno (L); zigóteno (Z); paquíteno (P); diplóteno (D); espermátide arredondada (Ar); espermátide em alongamento/ alongada (Al). (CASTRO, 2012)..... 24

CAPITULO 1: Efeitos da inalação crônica de partículas da exaustão do diesel sobre a espermatogênese de ratos Wistar Adultos.

FIGURE 1: Fotomicrografia do parênquima pulmonar de rato Wistar adulto do grupo exposto às DEP GT, submetido a exposição de 10 µg de partículas da exaustão do diesel em solução fisiológica de NaCl (4mL) diariamente por 90 dias. Coloração HE. Barra=11µm. A. Macrófagos intra-alveolares (M); B. DEP presente no interstício do parênquima pulmonar; C. DEP presente no interior dos alvéolos pulmonares; D. Macrófagos intersticiais (M) apresentando material particulado fagocitado. 50

FIGURE 2: Frequency of stages of seminiferous epithelium cycle of adult Wistar rats exposed to low dose of diesel exhaust particles (DEP=10µg) added to 0.9% NaCl solution (4ml). Results are reported as means ± SD. [G-DEP = Groups exposed to diesel exhaust particles (DEP=10µg). CG = non- exposed group *P<0.05 compared to control group (Student t-test). 50

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1: Efeitos da inalação crônica de partículas da exaustão do diesel sobre a espermatogênese de ratos Wistar Adultos.

TABELA 1: Dados biométricos e morfométricos em ratos Wistar adultos.....	48
TABELA 2: Diâmetro nuclear médio das células germinativas e nucleolar de célula de Sertoli de ratos Wistar adultos.....	48
TABELA 3: Contagens de células e razões celulares por secções transversais de túbulos seminíferos em ratos Wistar adultos	49

LISTA DE ABREVIATURAS

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

G-DEP – Diesel Exhaust exposed group

G-PDE – Grupo exposto às partículas do Diesel

HCG – Gonadrofina Coriônica Humana

HPA's – Polycyclic aromatic hydrocarbons

IGF-I – Insulin Growth Factor 1

TGF α – Fator de crescimento transformante α

TGF β – Fator de crescimento transformante β

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1 MATERIAL PARTICULADO E PARTÍCULAS DA EXAUSTÃO DO DIESEL	14
2.2 TESTÍCULO E ESPERMATOGÊNESE	17
2.3 CÉLULAS DE SERTOLI	21
2.4 CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E DURAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE	22
2.5 QUANTIFICAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE	25
2.6 TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DO MATERIAL PARTICULADO.....	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 GERAL	29
3.2 ESPECÍFICOS.....	29
CAPÍTULO 1	30
“EFEITOS DA INALAÇÃO CRÔNICA DE PARTÍCULAS DA EXAUSTÃO DO DIESEL SOBRE A ESPERMATOGÊNESE DE RATOS WISTAR ADULTOS”	30
5 CONCLUSÕES.....	55
6 PERSPECTIVAS.....	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

Partículas de exaustão do diesel (PED) são compostas por milhares de componentes químicos, incluindo óxido de nitrogênio, compostos contendo dioxina e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (CLUNIES et al., 1996; BROUWER et al., 1995). De acordo com Pope et al. (1995) e Sagai et al. (1996), as PED têm diversos efeitos nocivos sobre a saúde humana, tais como rinites alérgicas, asma e câncer. Os compostos químicos presentes na poluição atmosférica têm sido relacionados direta e indiretamente com desordens no trato reprodutivo (MAISONET et al., 2004)

Estudos experimentais têm relatado interferência do material particulado proveniente da combustão do diesel sobre os órgãos e processos reprodutivos em várias fases da vida do indivíduo (HUANG et al., 2008; ONO et al., 2008; PIRES et al., 2011). Exposições durante o desenvolvimento do embrião reduzem o número de nascidos vivos, em decorrência de maior número de falhas na implantação embrionária (MOHALLEM et al., 2005; LICHTENFELS et al., 2006). A exposição a poluentes está relacionada com o aumento da ocorrência de distúrbios reprodutivos (MEHTA et al., 2003). A injeção de PED em camundongos adultos provoca supressão da função testicular com redução da produção diária de espermatozoides (IZAWA et al., 2007). Alterações morfológicas testiculares tais como: edema intersticial, degeneração dos túbulos seminíferos, descamação do epitélio germinativo, necrose e redução do número de espermatozoides têm sido observadas (YOSHIDA et al., 1999). Watanabe e Oonuki (1999) relatam que exposições gestacionais à partículas geradas pela combustão do diesel podem provocar redução do número de células de Sertoli e das células germinativas com consequente queda na produção diária de espermatozoides na idade adulta. Além disso, Fortoul et al. (2007) mostram que metais como o vanádio, que é produzido na combustão veicular, pode provocar alterações estruturais nos túbulos seminíferos de camundongos.

A maioria dos estudos apresentam uma grande variedade de protocolos e consequentemente divergências quanto às respostas biológicas, uma vez que o estágio de desenvolvimento do organismo modelo utilizado e o próprio período de análise dos dados após a exposição podem causar variações nos efeitos observados. Dessa forma o presente estudo caracterizou, em ratos adultos, os efeitos da exposição à concentração de $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PED de acordo com a recomendação da Organização Mundial da Saúde para estudos de longa duração. Com base nos dados anteriormente citados, foram caracterizadas alterações

morfológicas testiculares, densidade volumétrica dos compartimentos testiculares, processo espermato gênico e produção espermática diária.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 MATERIAL PARTICULADO E PARTÍCULAS DA EXAUSTÃO DO DIESEL

A United Nations Environment Programme/World Health Organization - UNEP/WHO (UNEP., 1994) define material particulado (MP) em suspensão como sendo o conjunto de partículas sólidas e líquidas suspensas e dispersas no ar. Essas partículas variam em composição química, tamanho e forma, parâmetros ópticos e características elétricas. O material particulado é classificado pelo diâmetro aerodinâmico médio das partículas: a) partículas inaláveis grossas possuindo diâmetro aerodinâmico médio no intervalo de 2,5 a 10 μm ($\text{MP}_{2,5-10}$) e b) partículas finas ou respiráveis que são inferiores a 2,5 μm ($\text{MP}_{2,5}$). Recentemente o MP inferior a 2,5 μm foi denominado de partículas quase-ultrafinas ($\text{MP}_{0,25}$) e ultrafinas ($\text{MP}_{0,1}$) (MINGUILLÓN et al., 2008). As partículas inaláveis grossas ($\text{MP}_{2,5-10}$) têm origem nos processos mecânicos, como ressuspensão de poeira do solo, do sal marinho, das cinzas de combustão e das emissões biogênicas naturais (CEPA, 1999). Partículas respiráveis ($<\text{MP}_{2,5}$) podem ser geradas por processos de combustão empregados no setor industrial e da frota veicular, além de formação secundária por meio de reações atmosféricas de gases como, por exemplo, a formação de sulfatos a partir de dióxido de enxofre (SO_2) (FREITAS & SOLCI, 2009).

Estudos observacionais têm procurado mostrar, com resultados cada vez mais significativos, efeitos de morbidade e mortalidade associados aos poluentes do ar (WHO, 2003; BRAGA et al., 2010).

Aumento em curto prazo nos níveis de MP está associado com um aumento nas taxas de mortalidade e morbidade (BELL et al., 2004). Em estudo de monitoramento da qualidade do ar em sete grandes capitais do Brasil verificou-se um intervalo de concentrações anuais entre 28 - 7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$, resultando em uma taxa de mortalidade de aproximadamente 13.000 óbitos por ano nas regiões metropolitanas estudadas (MIRANDA et al., 2011), enquanto os guias de qualidade do ar da Organização Mundial da Saúde estabelecem a concentração média anual de $\text{MP}_{2,5}$ abaixo de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (WHO/AQG, 2006).

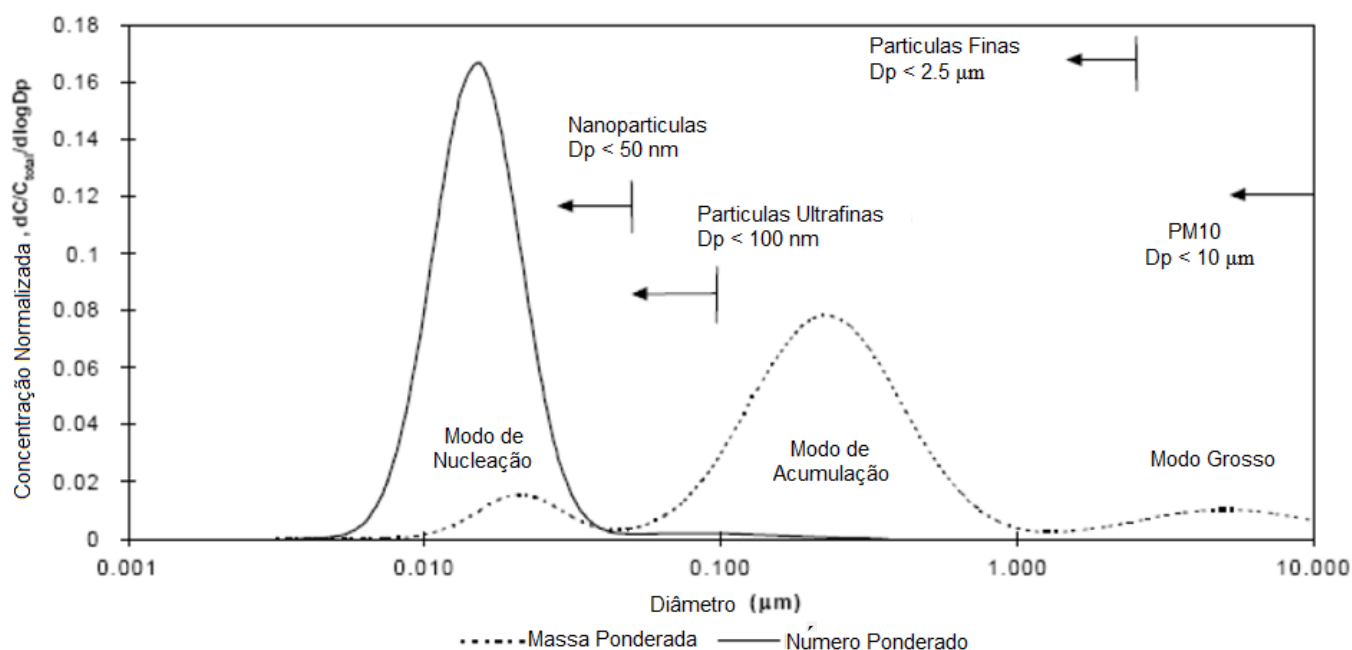
Partículas de exaustão do diesel (PED) contribuem substancialmente para a toxicidade crônica e aguda do MP inalado, sendo um importante componente do MP ambiental (U.S.

EPA, 2002). Entre as partículas da queima de combustíveis fósseis, as emissões produzidas pela queima do diesel são as mais estudadas. São compostas por milhares de componentes químicos, incluindo, óxido de nitrogênio, compostos contendo dioxina e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (CLUNIES et al., 1996; BROUWER et al., 1995).

Os compostos químicos presentes na poluição atmosférica têm sido relacionados direta e indiretamente com riscos para a saúde humana enquanto exposições agudas e crônicas ao MP atmosférico e as PED foram relacionadas com desordens no trato reprodutivo. Estudos epidemiológicos de coorte têm indicado que a exposição crônica ao MP é um fator de risco provável a formação de câncer de pulmão, bem como um perigo potencial para o desenvolvimento de outras doenças do trato respiratório (POPE et al., 2002). Experiências com animais têm permitido o estudo dos efeitos de exposição às PED, que, com a toxicologia “in vitro”, tem explicado a patogênese das doenças após a exposição. Exposição crônica às PED afeta animais de laboratório alterando a sobrevivência, a função pulmonar, a inflamação, a histopatologia, e a tendência ao desenvolvimento de câncer (NIKULA et al., 1995).

A deposição das partículas no pulmão depende do seu diâmetro aerodinâmico. Segundo Kittelson (1998) as PED existem na atmosfera em um padrão trimodal com base no tamanho e na massa ponderada das partículas durante as emissões, nas quais a maior parte da massa encontra-se no modo de acumulação com 0,05-1,0 μm de diâmetro. O modo grosseiro ($> 1,0 \mu\text{m}$ de diâmetro) contém cerca de 5-20% da massa das partículas, enquanto as partículas ultrafinas que compõem o modo nuclear ($< 0,05 \mu\text{m}$ de diâmetro) são tipicamente 1-20% da massa das emissões, representando, no entanto 90% do número das partículas emitidas (Figura 1).

Figura 1: Esquema da distribuição do material particulado pelo diâmetro aerodinâmico da partícula de acordo com a massa ponderada e número ponderado (adaptado de KITTELSON, 1998)



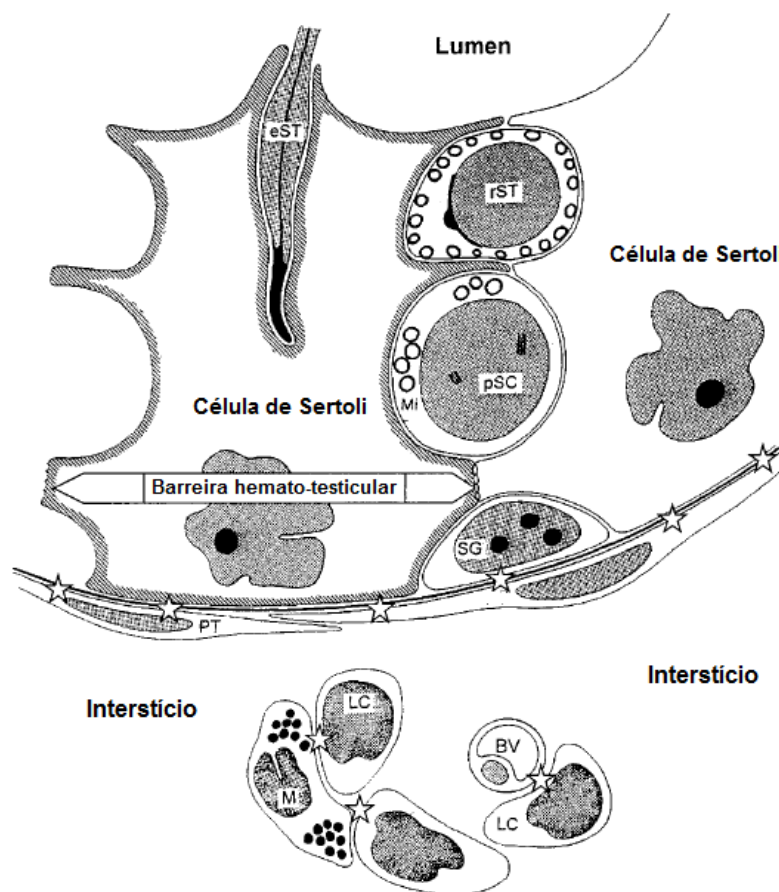
As partículas finas que atingem as vias respiratórias inferiores podem causar problemas respiratórios e mortes prematuras, não existindo mecanismos de expulsão destes poluentes. Enquanto que o particulado grosso tende a se acumular nas vias respiratórias superiores e assim, pode ocorrer a expulsão do mesmo (SALDIVA et al., 1992). Isto é provável porque, em comparação com as partículas maiores, as partículas ultrafinas possuem maior número de nanopartículas, maior eficiência de deposição nas vias aéreas e maior concentração por área de superfície. A maior concentração de componentes orgânicos induz as respostas ao estresse oxidativo (LI et al., 2003). A capacidade de translocação das partículas ultrafinas, nos variáveis sítios de deposição pulmonar, é particularmente relevante na avaliação dos efeitos cardiovasculares causados pelo material particulado inalado (ELDER & OBERDÖRSTER, 2006). Dessa forma, exposição a agentes poluentes pode ser definida como “inalação toxicológica” em referência às rotas pelas quais os agentes toxicológicos chegam até o pulmão, órgãos e tecidos distantes e “toxicologia do trato respiratório” em referência às mudanças anormais no trato respiratório, causados por agentes transportados pelo ar e ocasionalmente pela corrente sanguínea (SCHULZ & MUHLE, 2000).

2.2 TESTÍCULO E ESPERMATOGÊNESE

O testículo dos mamíferos é um órgão de forma oval ou arredondada, geralmente localizado no escroto que possui funções exócrina e endócrina que pode ser dividido em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial, e o compartimento de túbulos seminíferos (Figura 2) (RUSSELL et al., 1990). Encontra-se envolto pela túnica albugínea, a qual é constituída de tecido conjuntivo fibroso e, em algumas espécies por células contráteis (SETCHELL, 1991). Esta túnica é contínua com trabéculas de tecido conjuntivo formando os septos testiculares que convergem para o interior do testículo no sentido do mediastino testicular sendo a quantidade de tecido conjuntivo muito variável em diferentes espécies (RUSSELL et al., 1990a) bem como sua quantidade na região do mediastino testicular (FRANÇA & RUSSEL, 1998; GONDINHO, 1999; PAULA et al., 1999; SILVA JR, 2000). Os elementos componentes do compartimento intertubular são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (SETCHELL, 1991).

Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto ao percentual dos diferentes componentes deste compartimento (FAWCETT et al., 1973; FRANÇA & RUSSELL, 1998; GODINHO, 1999), a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais frequente, podendo seu percentual nos testículos de animais sexualmente maduros, no período reprodutivo, variar de aproximadamente 1% em carneiros até cerca de 35% em capivaras (FRANÇA & RUSSELL, 1998; PAULA et al., 1999; HESS & FRANÇA, 2007).

Figura 2: Esquema representativo dos Compartimentos do Túbulo Seminífero: SG: espermatogônias; pSC: Espermatocito primários; rST: Espermátides Arredondadas; eST: espermátides alongadas e Célula de Sertoli e Compartimento Intersticial: LC: Célula de Leydig; M: Macrófagos e BV: Vasos Sanguíneos (adaptado de SCHLATT, 1997)



As células de Leydig caracterizam-se morfologicamente pela grande quantidade de retículo endoplasmático granular desenvolvido e mitocôndrias com cristas tubulares (RUSSELL et al., 1996). São especializadas na produção de esteroides a partir do colesterol como molécula base (BARDIN, 1996). Estes andrógenos produzidos são principalmente a testosterona e a diidrotestosterona os quais são responsáveis pela diferenciação do sistema genital masculino e da genitália externa na fase fetal (PELLINIEMI et al., 1996). São sintetizados sob o estímulo do hormônio luteinizante (LH) por meio de receptores para andrógenos presentes na membrana das células somáticas intersticiais, tubulares e da própria célula de Leydig (SCHLATT et al., 1997). São responsáveis ainda, pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e a manutenção quantitativa das células germinativas a partir da puberdade (SHARPE, 1994), com auxílio do hormônio folículo-estimulante (FSH) na

iniciação e manutenção da espermatogênese (RUSSELL et al., 1993; PLANT & MARSHALL, 2001).

Durante o desenvolvimento testicular diversos fatores, desempenham papel importante na proliferação e diferenciação das células de Leydig, podendo ser citados dentre eles IGF-I, TGF α , TGF β , LH e HCG, hormônios tireoidianos e citocinas produzidas pelos macrófagos (MENDIS-HANDAGAMA & ARIYARATNE, 2001).

O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo, ocupando, na grande maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (FRANÇA & RUSSELL, 1998; HESS & FRANÇA, 2007). O epitélio do túbulo seminífero apresenta dois tipos celulares de origem embriológica diferentes, sendo as células da linhagem germinativas de origem do epiblasto, enquanto que as células de Sertoli são de origem celomática (KARL & CAPEL, 1998). Os túbulos seminíferos apresentam em sua divisão, uma porção intermediária bem desenvolvida chamada de túbulo contorcido e duas menores periféricas chamadas de túbulos retos que conectam em sequência a rede testicular no mediastino. Esta por sua vez continua com os ductos deferentes que desembocam no ducto epididimário (AMANN, 1981a; ILIO & HESS, 1994).

Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (França & Russell, 1998). No camundongo e no rato, existem aproximadamente 20 túbulos seminíferos por testículo, perfazendo no total cerca de 2 metros de comprimento tubular por testículo (BASCOM & OSTRUD, 1925, SCHETELL et al., 1991). Enquanto no suíno doméstico existem de várias centenas a alguns poucos milhares de túbulos seminíferos por testículo e aproximadamente 3000 metros de túbulos no total (FRANÇA & RUSSELL, 1998).

De maneira geral, o valor observado para o diâmetro tubular na grande maioria das espécies de mamíferos está em torno de 180 μ m a 300 μ m, enquanto se observa de 10 a 15 metros de túbulos seminíferos por grama de testículo (FRANÇA & RUSSELL, 1998; ROOSEN-RUNGE, 1977). Os túbulos seminíferos não apresentam vascularização ou inervação e são constituídos de túnica própria, epitélio e lume. A túnica própria reveste externamente o epitélio seminífero, sendo constituída por células mióides ou peritubulares além de elementos acelulares (fibras colágenas e membrana basal) que juntos formam a membrana limitante do túbulo seminífero (RUSSELL et al., 1990a, DYM, 1994). As células mióides são contráteis, sendo consideradas responsáveis pela movimentação e propulsão de espermatozoides do lume (KARL & CAPEL, 1998; CAPEL, 2000). As células mióides e as

células de Sertoli são responsáveis pela síntese da membrana basal que dá suporte estrutural tanto para a própria célula de Sertoli quanto para as células germinativas presentes no compartimento basal do túbulo seminífero (DYM, 1994). O lume tubular de animais sexualmente maduros contém o fluido secretado pelas células de Sertoli bem como espermatozoides recém-espermiados (SCHETELL, 1991).

A espermatogênese consiste em um processo cíclico altamente organizado que ocorre nos túbulos seminíferos, onde as espermatogônias diploides se diferenciam em espermatozoides. Este processo é altamente complexo e bem organizado que ocorre nos túbulos seminíferos durando cerca de 30 a 78 dias nos mamíferos (FRANÇA & RUSSELL, 1998; FRANÇA et al., 1998; HESS & FRANÇA, 2007).

Com base em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: (a) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas; (b) fase meiótica ou espermatocitária, onde o material genético é duplicado, recombinado e segregado, sendo esta fase muito importante para a variabilidade genética entre membros da mesma espécie; e (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual células haploides formadas se transformam em células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (RUSSELL et al., 1990; SHARPE, 1994). A espermatogênese tem início com sucessivas divisões mitóticas da espermatogônia tronco antes de se tornar espermatócito. Em seguida cada espermatócito passa por duas divisões meióticas e formam espermátides. Em ratos e camundongos, em geral, cada espermatogônia tronco se divide nove vezes podendo formar 4100 espermatozoides (RUSSELL et al., 1990a).

Em animais de laboratório com espermatogênese bem estabelecida, as espermatogônias podem ser classificadas em duas categorias básicas de acordo com a presença e distribuição da heterocromatina: espermatogônias indiferenciadas ou imaturas e diferenciadas ou maduras (DE ROOIJ & RUSSELL, 2000; CHIARINI-GARCIA & RUSSELL, 2001). À primeira categoria pertencem as espermatogônias isoladas (Ais), pareadas (Apr) e alinhadas (Aal), sendo as isoladas consideradas funcionalmente como espermatogônias tronco. As espermatogônias indiferenciadas estão localizadas em regiões específicas do epitélio seminífero denominadas de nichos (CHIARINI-GARCIA & RUSSELL, 2001; CHIARINI-GARCIA et al., 2001; RYU et al., 2006). A segunda categoria compreende espermatogônias do tipo A (A1-A4 em várias espécies de mamíferos), intermediárias (In) e do tipo B, comprometidas com a formação dos espermatozoides. A

disposição da cromatina nuclear é frequentemente utilizada como principal referência para se distinguir os diferentes tipos espermatogoniais, uma vez que a quantidade de cromatina associada ao envoltório nuclear aumenta gradativamente da espermatogônia do tipo A isolada até a do tipo B (CHIARINI-GARCIA & RUSSELL, 2001). O esquema a seguir ilustra a provável sequência das células espermatogênicas em ratos e camundongos, desde a espermatogônia isolada (Ais) até a formação de espermátides: **Ais** → **Apr** → **Aal(1-4)** → **A1** → **A2** → **A3** → **A4** → **In** → **B** → **espermátócitos primários** → **espermátócitos secundários** → **espermátides**.

Existem consideráveis diferenças em relação ao número de gerações de espermatogônias diferenciadas em mamíferos. No entanto, nas diversas espécies de mamíferos investigadas, este número não ultrapassa seis gerações (FRANÇA & RUSSELL, 1998; DE ROOIJ & RUSSELL, 2000).

2.3 CÉLULAS DE SERTOLI

O tipo celular mais abundante no túbulo seminífero até o início da puberdade é a célula de Sertoli, no entanto a partir desse estágio sua população permanece relativamente estável por toda vida (RUSSELL et al., 1990). A população de células de Sertoli nos testículos de mamíferos sexualmente maduros, estão completamente diferenciadas. A considerável variação morfológica e estrutural da célula de Sertoli durante o ciclo do epitélio seminífero (CES) demonstra o alto grau de plasticidade desta célula mediante as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem nas células germinativas, recebendo dessa forma, denominações como célula de suporte, célula de sustentação, célula ramificada e *nurse cell* (FRANÇA et al., 1993; YE et al., 1993; FRANÇA & HESS, 2005).

As células de Sertoli possuem núcleo com grande nucléolo tripartido visível ao microscópio óptico com massas de heterocromatina associadas se estendendo da lâmina basal até o lume do túbulo seminífero (RUSSELL et al., 1990). Basolateralmente a célula de Sertoli apresenta junções oclusivas (*tight junctions*) formando a barreira (Hematotesticular ou Barreira de célula de Sertoli) composta por dois compartimentos permanentes denominados de compartimentos basal e adluminal, existindo ainda um transitório chamado de compartimento intermediário (RUSSELL et al., 1990a). Dessa forma, o compartimento adluminal está totalmente sob controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente imunoprivilegiado, condição indispensável ao desenvolvimento do processo espermatogênico

(RUSSELL et al., 1990a; SETCHELL, 1991; SHARPE, 1994). Além de promover a compartimentalização do túbulo seminífero, estas células desempenham outras funções tais como nutrição, suporte físico para as células germinativas em desenvolvimento, manutenção da integridade do epitélio seminífero, secreção de fluido luminal, secreção de fatores de crescimento e de proteínas, participação na espermiação liberando as espermátides no lume tubular, fagocitose de células germinativas em degeneração e excesso de citoplasma (corpo residual) após liberação das espermátides, além de esteroidogênese e metabolismo de esteroides (CARREAU et al., 1999; HESS, 2000). As células de Sertoli ainda são alvo de hormônios, mediando a ação do FSH e da testosterona na espermatogênese, provavelmente de maneira cíclica (RUSSELL et al., 1990a; FRANÇA & RUSSELL, 1998).

O fluido testicular secretado pelas células de Sertoli em direção ao lume tubular possui substâncias importantes para a função epididimária e maturação espermática, servindo também de veículo para o transporte dos espermatozoides (ILIO & HESS, 1994). A secreção do fluido testicular também ocorre em direção ao compartimento intersticial participando de mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo como células mioides, células de Leydig e células musculares lisas dos vasos (SHARPE, 1994; FRANÇA & RUSSELL, 1998; HESS E FRANÇA, 2007).

Durante o processo espermatogênico as células de Sertoli interagem com as células germinativas de forma bastante complexa, tanto física quanto bioquimicamente. Além das junções de oclusão as células de Sertoli conectam-se com a lâmina basal e com as células germinativas por meio de especializações ectoplasmáticas e complexos túbulo-tubulares tais como junções aderentes (hemidesmossomos e desmossomos) e junções comunicantes (*gap junctions*) (CHENG & MRURK, 2002). É bastante evidente a necessidade da interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo principalmente células de Sertoli, células de Leydig e células mioides para que o processo espermatogênico transcorra de forma normal e eficiente (RUSSELL et al., 1994; GRISWOLD, 1995; FRANÇA & RUSSELL, 1998).

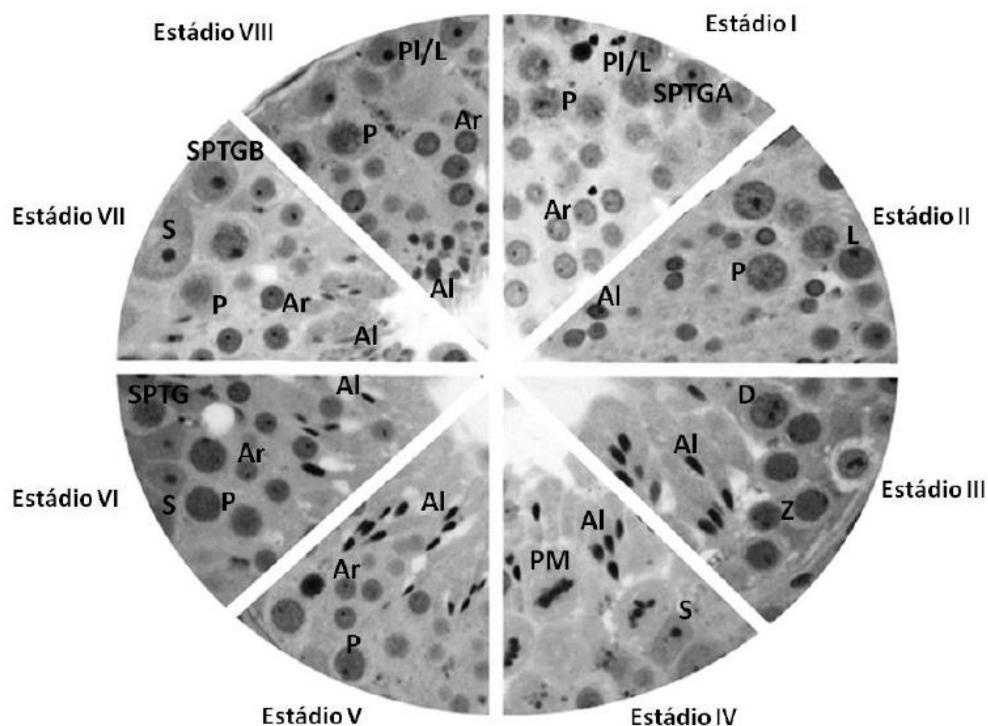
2.4 CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO (CSE) E DURAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros as células germinativas não estão organizadas ao acaso e sim em associações celulares características denominadas de

estádios, os quais se sucedem com o tempo de maneira bastante ordenada, formando o ciclo do epitélio seminífero (CES) (RUSSELL et al., 1990a; FRANÇA, 1991; GONDINHO, 1999). Na grande maioria dos mamíferos estudados, exceto alguns primatas, dentre eles o homem, o arranjo dos estádios do epitélio seminífero é segmentar e geralmente apenas um estágio é observado por secção transversal de túbulo seminífero (SHARPE, 1994). Em uma determinada área de túbulo seminífero, a sequência de eventos que ocorre entre o desaparecimento de uma determinada associação celular até o seu reaparecimento caracteriza o ciclo do epitélio seminífero (ROOSEN-RUGEN & GIESEL, 1950; LEBRLOND & CLERMONT, 1952; CLERMONT, 1972, FRANÇA, 1991). Cerca de 4 ciclos e meio são necessários para que o processo espermatogênico se complete em mamíferos, ou seja, desde uma espermatogônia do tipo Ais até a liberação dos espermatozoides no lume tubular (AMANN & SCHANBACHER, 1983).

Os estádios do CES podem ser classificados pelo método da morfologia tubular que estabelece 8 estádios do ciclo baseado na forma e localização das espermatídes, presença de figuras de divisão meiótica e no arranjo das espermatídes no epitélio seminífero (BERNDTSON, 1977; FRANÇA & RUSSELL, 1998) e pelo método do sistema acrossômico que tem como referência o desenvolvimento do acrossomo e na morfologia dos núcleos das espermatídes (LEBLOND & CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990). Este método divide os estádios de forma arbitrária variando para cada espécie entre 6 e 14 estágios (AIRE et al., 1980, RUSSELL et al., 1990; FRANÇA & RUSSELL, 1998; COSTA et al., 2008). A Figura 3 ilustra os 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero em jaguatirica.

Figura 3: Montagem fotográfica dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero em jaguatirica (*Leopardus pardalis*). Espermatogônia (SPTG); espermatogônia A (SPTGA); espermatogônia B (SPTGB); célula de Sertoli (S); espermatócito em pré-leptóteno/ leptóteno (PL/L); leptóteno (L); zigóteno (Z); paquíteno (P); diplóteno (D); espermátide arredondada (Ar); espermátide em alongamento/ alongada (Al). (CASTRO, 2012)



A duração do CES é considerada uma constante biológica espécie-específica que está sob o controle do genótipo da célula germinativa (FRANÇA et al., 1998). Para o cálculo da duração do ciclo do epitélio seminífero utiliza-se o método de injeção de timidina triciada (FRANÇA, 1991; PAULA, 1991; GUIÃO-LEITE et al., 2006; BITTENCOURT et al., 2007) ou bromodeoxiuridina (BrdU) (BALARINI et al., 2011). No momento da injeção o radioisótopo é incorporado ao DNA em replicação de células em interfase nos tipos espermatogoniais, encontradas nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero, e em espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno, sendo estes o último tipo celular a incorporar marcadores (timidina triciada ou BrdU) em seu núcleo. A associação entre as frequências relativas dos diferentes estádios do CES e pré-leptóteno/leptóteno marcados são pontos de referência para a determinação do cálculo da duração do CES, em associação com a

frequência dos estádios percorridos após diferentes tempos de injeção (CLERMONT, 1972; FRANÇA & CARDOSO, 1998; FRANÇA et al., 1998a; GODINHO, 1999). Sendo, portanto, possível determinar a taxa de produção espermática com base no conhecimento dos estádios que compõem o CES em conjunto com a análise histomorfométrica do testículo (AMANN & SCHANBASCHER, 1983; FRANÇA, 1991).

2.5 QUANTIFICAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE

Na quantificação da espermatogênese, é fundamental o conhecimento do CES, a caracterização dos estádios que o compõem, a determinação da frequência destes estádios, bem como o cálculo da duração dos eventos espermatogênicos. Este último parâmetro é, aliás, essencial para se determinar a produção espermática diária de qualquer espécie ou raça. Normalmente existe correlação positiva entre o diâmetro tubular e a atividade espermatogênica do testículo (FRANÇA & RUSSELL, 1998).

A análise da morfofisiologia testicular, especialmente daqueles aspectos relacionados com a atividade espermatogênica, é fundamental para propiciar uma visão dos efeitos de uma determinada substância sobre a função reprodutiva da espécie. De acordo com Amann & Schanbacher (1983), a biometria testicular deve ser parte integrante de qualquer exame andrológico ou de experimentos que envolvam a função reprodutiva masculina, possibilitando, assim, a verificação da normalidade dos testículos e o estabelecimento do potencial de produção de espermatozoides, dentre outros parâmetros. A obtenção da proporção volumétrica entre os diversos componentes do testículo e do epitélio seminífero, também fornece importantes dados para se avaliar a função testicular (RUSSELL et al., 1990b; FRANÇA, 1991).

Estudos têm mostrado que o número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da produção espermática e do tamanho do testículo (FRANÇA et al., 1995; ROCHA et al., 1999; MIRANDA, 2002; FRANÇA & HESS, 2005). Tal pressuposto baseia-se no fato de que as células de Sertoli têm uma capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixa para cada espécie, e que a população deste tipo celular mantém-se estável após a puberdade (ORTH, 1982; ORTH et al., 1988; FRANÇA & RUSSELL, 1998), não havendo alteração no seu número ao longo dos estádios do CES (ROOSEN-RUNGE & GIESEL Jr., 1950; WING & CHRISTENSEN, 1982; FRANÇA, 1991; NEVES et al., 2002). Desta forma, o número de células germinativas suportadas por uma

única célula de Sertoli é a melhor indicação da eficiência funcional da célula de Sertoli e da produção espermática (RUSSELL & PETERSON, 1984; SINHA-HIKIM et al., 1989; FRANÇA & RUSSELL, 1998; FRANÇA & HESS, 2005).

Em termos de eficiência da produção espermática por unidade de área de túbulo seminífero, o índice mais importante é o número de espermátides por célula de Sertoli (RUSSELL & PETERSON, 1984; FRANÇA & RUSSELL, 1998). A produção espermática diária por grama de testículo, que depende da estimativa prévia da duração da espermatogênese, é uma abordagem bastante eficaz para se medir a eficiência espermatogênica, sendo bastante útil nas comparações entre diferentes espécies.

A alta eficiência da espermatogênese observada em determinadas espécies de mamíferos é decorrente principalmente do alto número de células de Sertoli por grama de testículo e alta capacidade de suporte das células de Sertoli, alto percentual de túbulos seminíferos no testículo, maior número de gerações de espermatogônias, baixa perda de células durante a espermatogênese e curta duração do ciclo do epitélio seminífero (FRANÇA & RUSSELL, 1998; JOHNSON et al., 2000; FRANÇA & HESS, 2005). Dessa forma, o estudo quantitativo das células que compõem o epitélio seminífero em secções transversais de túbulos seminíferos é essencial para o entendimento do processo espermatogênico em si, possibilitando valiosas correlações com achados fisiológicos e bioquímicos (RUSSELL et al., 1990b). Este estudo permite, ainda, um entendimento mais completo da espermatogênese e também de como a estrutura testicular se comporta em condições experimentais e patológicas (FRANÇA et al., 1993).

Portanto, além de permitir a determinação do rendimento intrínseco da espermatogênese (FRANÇA *et al.*, 1988), a avaliação histológica quantitativa dos testículos torna também possível a verificação de normalidade ou não da espermatogênese, a observação do tipo celular que está sofrendo degeneração, ou mesmo se ocorre degeneração em condições fisiológicas ou experimentais (CLERMONT & MORGENTALER, 1955; RUSSELL et al., 1990b; FRANÇA et al., 1994).

Para avaliação da produção espermática diária, vários métodos podem ser utilizados (BERNDTSON, 1977), entre eles o método histológico ou histométrico descrito por Amann & Almquist (1962) amplamente empregado no Laboratório de Morfometria do Departamento de Anatomia-UFPE por propiciar resultados tão acurados quanto aqueles obtidos com metodologias mais tradicionais, tais como o método hemocitométrico e a quantificação através de canulação dos ductulos eferentes (AMANN & ALMQUIST, 1962).

2.6 TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DO MATERIAL PARTICULADO

De acordo com a WHO (2005a), dados epidemiológicos têm mostrado que a exposição humana à poluição gerada pelos veículos tem resultado em aumento na incidência de cardiopatias, doenças respiratórias, aumento da resposta inflamatória, mudanças na regulação do sistema nervoso autônomo e efeitos na saúde reprodutiva. Devido à suscetibilidade a agentes toxicológicos durante as fases embrionária e neonatal, a saúde feminina recebeu grande atenção inicialmente (Pereira et al., 2004). Exposição durante o período gestacional à poluição atmosférica ambiental aumentou a incidência de falhas na implantação embrionária e menor número de nascidos vivos em fêmeas de camundongo (MOHALLEM et al., 2005).

Os estudos experimentais desenvolvidos por Ritz et al. (2011) demonstraram que ninhadas da geração F1 de ratas expostas a partículas de exaustão do diesel apresentaram uma redução no peso corporal durante a lactação e redução nas taxas de crescimento. Lichtenfels et al. (2006) mostraram que a proporção de sexo no nascimento foi significativamente diferente nos grupos expostos à poluição, com redução no número de filhotes machos no grupo exposto a exaustão não filtrada. Rosa et al. (2003) também relataram que a exposição ocupacional e sazonal a poluição gerada pelo tráfego também tem afetado a saúde reprodutiva masculina reduzindo a qualidade do sêmen, com consequente prejuízo a fertilidade entre homens jovens. De acordo com estudo experimental desenvolvido por Koivisto et al (1998), compostos tóxicos inaláveis como o 1,3-butadieno derivado de fontes móveis e da indústria petroquímica apresentam danos a reprodução podendo alterar o DNA de camundongos.

Huang et al. (2008) relatam que animais expostos à partículas de exaustão de motocicletas diluídas 1:10 durante 4 semanas apresentaram diminuição no peso corporal e redução de peso relativo do testículo, sem efeitos no peso do epidídimo. Os túbulos seminíferos apresentavam-se atrofiados, com ausência de espermatídes alongadas, diminuição dos espermátócitos e presença de células gigantes multinucleadas no epitélio seminífero severamente danificado. As análises morfológicas realizadas por Kubo-Ire et al. (2005) têm mostrado alta incidência de anormalidades espermáticas em homens inférteis, enquanto Lichtenfels et al. (2006) demonstraram experimentalmente uma redução na contagem de espermatozoides, número de células germinativas e espermatídes alongadas no testículo de camundongos em relação ao grupo exposto a exaustão filtrada.

Exposição pós-natal de ratos Wistar à exaustão do diesel apresentou redução no número de espermatídes em fases 18 e 19 de desenvolvimento do sistema acrossômico em

túbulos seminíferos em estágios VI, VII e VIII; redução no número de espermatogônias e espermatócitos em paquíteno em túbulos seminíferos em estágio II –III; redução no número de espermatogônias nos túbulos seminíferos em estágio XIII e espermatócitos em paquíteno em túbulos seminíferos em estágio VII além de redução do número de espermatócitos em zigóteno (WATANABE & OONUKI, 1999).

Segundo Yoshida (1999), os túbulos seminíferos de camundongos expostos a exaustão de PED em concentrações de 0,3, 1,0 e 3,0 mg/m³ apresentaram alterações degenerativas e necróticas, descamação do epitélio seminífero e perda de espermatozoides, além de células de Leydig com características degenerativas tais como aumento da densidade das gotículas lipídicas e presença de lisossomos secundários.

Watanabe & Oonuki, (1999); Watanabe, (2005) alegam que as células de Leydig e Sertoli dos grupos expostos à exaustão do diesel não apresentaram mudanças histopatológicas notáveis. A produção espermática por grama de testículo apresentou uma redução nos grupos expostos as PED (1,71 mg/m³ e 0,17 mg/m³), bem como um aumento na razão célula de Sertoli/espermatogônias, célula de Sertoli/espermatócitos (paquíteno), célula de Sertoli/espermátides quando comparados com o grupo controle (WATANABE, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Caracterizar a ação das partículas da exaustão do diesel (PED) no testículo de ratos *Wistar* adultos expostos ao processo de nebulização pneumática.

3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a influência da exposição às PED no desenvolvimento corpóreo, testicular e índice gonadossomático por meio de medidas de peso;
- Analisar a morfometria macro e microscópica dos testículos, incluindo proporções volumétricas entre componentes do parênquima testicular, diâmetro tubular, altura do epitélio e comprimento total dos túbulos seminíferos;
- Determinar o número de células do epitélio seminífero (células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos, espermatídes arredondadas e alongadas) em secções transversais de túbulo seminífero em estágio I do ciclo do epitélio seminífero;
- Avaliar a frequência dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero pelo método da morfologia tubular;
- Determinar as relações quantitativas entre células da linhagem espermatogênica e células de Sertoli;
- Calcular a produção espermática diária através do método histométrico (histologia quantitativa do testículo);

CAPÍTULO 1

“EFEITOS DA INALAÇÃO CRÔNICA DE PARTÍCULAS DA EXAUSTÃO DO DIESEL SOBRE A ESPERMATOGÊNESE DE RATOS WISTAR ADULTOS”

Artigo a ser submetido ao periódico



ISSN 1808-1657

Efeitos da inalação crônica de partículas da exaustão do diesel sobre a espermatogênese de ratos Wistar Adultos

Chronic inhalation effects of diesel exhaust particles on the spermatogenesis of adult Wistar rats

O. Campos-Júnior^{1,3}, F.C.R. Dias², S.R.S. Neves⁴, P.H.N. Saldiva⁵, A.V. Albuquerque⁶, Silva, A. A¹, M.T.S. Correia³, E.M. Neves^{1,5}, M.G, Carneiro-da-Cunha³

¹Departamento de Anatomia/Laboratório de Morfometria, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida professor Moraes rego s/n, CEP: 50740-600, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Biologia Geral/Laboratório de Biologia Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs, s/n, CEP: 36580-900, Viçosa, MG, Brasil.

³ Departamentos de Bioquímica/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida professor Moraes rego s/n, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil, Recife, PE, Brasil

⁴Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida professor Moraes rego s/n, CEP: 50740-600, Recife, PE, Brasil.

⁵ Departamentos de Patologia/Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo, n. 455 - Cerqueira César, CEP: 01246-903, SP, Brasil.

⁶Departamento de Cirurgia/Núcleo de Cirurgia Experimental, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida professor Moraes rego s/n, CEP: 50740-600, Recife, PE, Brasil.

Correspondência:

M.G, Carneiro-da-Cunha³. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária,
50670-90, Recife, PE, Brasil

Phone: +55-81-2126.8555 Fax: +55-81-2126.8554

E-mail: bethneves@hotmail.com

Running Title. Effects of diesel exhaust particle on rat spermatogenesis

Key Words: Spermatogenesis, air pollution, particulate matter.

RESUMO

Estudos vem investigando a possibilidade de que a exposição as partículas da exaustão do Diesel (DEP) estão envolvidas com o aumento de distúrbios reprodutivos como a redução da espermatogênese. Desta forma, o presente trabalho objetivou caracterizar o efeito da exposição às DEP sobre a espermatogênese de ratos Wistar adultos. Animais foram aleatoriamente divididos em: - Grupo teste exposto às partículas da exaustão do diesel GT e grupo controle GC. A exposição foi realizada com dispositivo de nebulização pneumático associado às câmaras de exposição individualizadas durante 90 dias consecutivos. Os animais do GT apresentaram redução dos pesos corporal e testicular enquanto o índice gonadossomático permaneceu normal. A proporção volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular não foram afetados. Entretanto, o aumento significativo da razão túbulo-epitélio no GT sugere comprometimento da função epitelial do túbulo seminífero. Os comprimentos do túbulo seminífero por testículo e o por grama de testículo diminuíram significativamente quando comparados ao GC. As populações celulares e o diâmetro celular por seção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 com base no método morfológico mostraram diferenças significativas na população de espermatídes arredondadas e redução significativa da população de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo. A frequência dos túbulos seminíferos nos estágios 2, 3, 5 e 6 foi diferente no grupo GT. A produção espermática diária (PED) por grama de testículo aumentou enquanto a PED por testículo foi menor nos animais expostos cronicamente às partículas da exaustão do diesel. Esses resultados indicam que a exposição ao DEP na concentração média estabelecida pela Organização Mundial da Saúde está associada com o comprometimento da produção diária de espermatozoides em ratos na idade adulta. Além do mais, os dados biométricos, morfológicos e estereológicos indicam que as DEP podem estar envolvidas em mecanismos que ativam mudanças na normalidade estrutural e funcional testicular de ratos expostos.

ABSTRACT

Studies have investigated the possibility that exposure to Diesel exhaust particles (DEP) may increase reproductive disorders such as spermatogenesis reduction. This work characterizes the DEP exposure effects on spermatogenesis adulthood rats. Animals were randomly divided into: GT - exposed group and CG – non-exposed group. The exposure system was performed as a pneumatic nebulization device coupled to 10 usual rat chambers lasting 90 days. In the GT animals presented decreased testis and body weight while the gonadosomatic index did not change. In the GT animals presented decreased testis and body weight while the gonadosomatic index did not change. In the GT animals presented decreased testis and body weight while the gonadosomatic index did not change. The volume density of tubular and intertubular compartments were not affected by exposure. Significant increase of seminiferous- tubule epithelium ratio In the GT suggests compromised seminiferous epithelial function. The seminiferous tubule length per testis and the seminiferous tubule length per gram of testis significantly smaller than than the GC. Seminiferous epithelium cells number and diameter per seminiferous tubule cross section at stage 1 based on morphological method showed significant differences in Sertoli cell round spermatids. Sertoli cells population per testis and per gram of testicular tissue was lower. Frequency of stages 2, 3, 5 and 6 seminiferous tubules were different in GDEP group. The daily sperm production per gram of testicular tissue was higher while the sperm production per testis was lower in the GT animals. These results indicate that exposure to DEP at levels in similar mean concentration established by the World Health Organization were associated with impairment of daily sperm production in adulthood rats. Furthermore, the biometric, morphological and stereological data indicate that DEP may be involved in the mechanisms that activate changes in normal mechanisms of testis structure and function of exposed rats testis.

INTRODUÇÃO

Em relatório recente do estado global do ar (SOGA/2017), a poluição do ar é claramente reconhecida como um dos fatores de maior importância para a saúde humana mundial (HEALTH EFFECTS INSTITUTE, 2017). As principais fontes de poluição são geradas através do tráfego de veículos por grandes empresas, indústrias siderúrgicas, combustão de biomassa em incêndios florestais e queima de lenha, esses fatores compõem uma parcela importante dos agentes poluidores, mostrando que a poluição não está restrita aos grandes centros urbanos (ARBEX et al., 2004).

A composição da poluição atmosférica nos maiores centros mundiais tem contribuição majoritária do material particulado da exaustão de motores movidos à diesel DE (KELLY; FUSSELL, 2015). A DE é uma mistura complexa de substâncias químicas provenientes da combustão incompleta do óleo que podem ser encontradas nos estados sólidos, líquidos ou gasosos. O tipo de motor, combustível, óleo e operações realizadas são alguns dos fatores que podem afetar a composição da DE (DEBIA et al., 2017).

A ação do material particulado nos sistemas biológicos está relacionado à sua classificação de acordo com o seu diâmetro aerodinâmico (GHIO et al., 2002). As dimensões das partículas se estendem de 0,1 μm (partículas ultrafinas), às partículas com diâmetro menor que 2,5 μm ($\text{PM}_{2,5}$) consideradas partículas finas e aquelas com diâmetro compreendido entre 2,5 e 10 μm classificadas como partículas grossas (PM_{10}) (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2013).

As DEP pertencem à classe de partículas inaláveis com diâmetros inferiores a 2,5 μm $\text{MP}_{2,5}$ e de um modo geral a maior parte das partículas presentes tem diâmetros aerodinâmicos na faixa de 0.1 à 0.25 (LEEM; JANG, 2014). Partículas maiores que 10 μm ficam depositadas nas vias aéreas superiores e são removidas pelo mecanismo de transporte mucociliar, as

menores que 10 μm , especialmente as com diâmetros menores que 2,5 μm , têm potencial para serem depositadas nos alvéolos e parecem ser as maiores responsáveis pelos efeitos provocados por esses poluentes (GHIO et al., 2002). Adicionalmente as partículas ultrafinas podem sofrer translocação através do tecido pulmonar nas vias aéreas inferiores sendo transferidas para nódulos linfáticos no pulmão e para a corrente sanguínea causando danos de forma sistêmica (PETERS et al., 2006).

Devido ao seu impacto negativo na saúde e no meio ambiente, as emissões de partículas de motores a diesel tem recebido cada vez mais atenção, sendo classificadas como agentes carcinogênicos do grupo 1 para humanos, tornando-se um contaminante de interesse primário a nível global (“IARC, 2012). De acordo com o relatório de monitoramento ambiental desenvolvido em seis capitais brasileiras, o risco de mortalidade foi estimado em cerca de 13.000 mortes anuais relacionadas a poluição atmosférica (DE MIRANDA et al., 2012).

Embora existam estudos acerca dos efeitos provocados por estes materiais, tanto na saúde quanto na qualidade de vida, o verdadeiro mecanismo das alterações provocadas pela poluição, seja em curto ou longos períodos de exposição, continua incerto (CARRÉ et al., 2017). Até o momento, sabe-se que as DEP provocam vários efeitos adversos na saúde humana, como câncer de pulmão, asma brônquica e rinite alérgica (JOHNSON; PETTY; NEAVES, 1981). No entanto, apenas alguns estudos relataram a associação das DEP com o aumento da incidência de distúrbios reprodutivos, como a redução da espermatogênese e a qualidade seminal (ABERCROMBIE, 2005; AMANN, 1961).

Alterações significativas em parâmetros biométricos e testiculares foram observadas em camundongos expostos cronicamente ao material particulado urbano $\text{PM}_{2.5}$ em ambos os períodos pré e pós- natal (PIRES et al., 2011). Mohallem et al. (2005) demonstraram em

estudo experimental a vulnerabilidade da saúde reprodutiva feminina em exposição à poluentes urbanos com aumento das falhas na implantação embrionária. Além do mais, Lichtenfels et al. (2007) demonstrou em modelos animais redução significativa na razão sexual secundária, indicando que a exposição a agentes poluentes podem alterar a proporção de espermatozoides X:Y.

Alterações testiculares como edema intersticial, degeneração dos túbulos seminíferos, descamação do epitélio e diminuição da contagem de espermatozoides foram descritas após a exposição ao DE em ratos (YOSHIDA et al., 1999). A exposição prolongada ao PM_{2.5} em ratos jovens afetam a estrutura histológica dos túbulos seminíferos reduzindo a produção diária de espermatozoides (YAN et al., 2016).

Diante da incidência de distúrbios reprodutivos e alterações na fertilidade, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da exposição crônica as DEP de acordo com a recomendação de (10 µg/m³) da Organização Mundial de Saúde (WHO) para a exposição média diária de PM_{2.5}. Portanto, foram examinados parâmetros biométricos e estereológicos dos testículos, células germinais e contagens de células germinativas e de Sertoli, frequências de ciclo de epitélio seminífero e, finalmente, a produção diária de espermatozoides.

MATERIAL E METODOS

Determinação e preparação das condições de exposição

Este estudo segue a recomendação da Organização Mundial de Saúde para a exposição média diária de PM_{2.5} de longo prazo, selecionando a concentração de 10 µg/m³ (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). O material particulado utilizado neste trabalho foi fornecido pelo Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Universidade de São Paulo (LPAE / USP) a partir do estudo da caracterização química de partículas da exaustão do

diesel DEP descritas anteriormente (FORTOUL et al., 2011). Noventa amostras de 1mg de DEP foram pesadas referindo-se a noventa dias de experimentação e em seguida armazenadas a 4 ° C. Foi adicionado 1 mg diário de DEP a 10 ml de solução de NaCl a 0,9% e a suspensão foi misturada com vórtex durante 10 minutos. Em seguida, 0,4 ml desta suspensão foi transportada por micropipetador e adicionada a 3,6 ml de solução de NaCl a 0,9%, em copo micro-nebulizador que foi conectado à um sistema de exposição multi-câmara de corpo completo para ratos. Dessa forma cada câmara de exposição recebeu uma dose com a concentração de 10µg/mL DEP suspensas por meio do processo de atomização de solução através de uma pressão de saída na faixa de 5psi; uma vazão de ar de aproximadamente 8 L/min fornecido por um compressor de potência 1/30 HP; produzindo partículas com diâmetro aerodinâmico na faixa de 0,3 a 0,8 µm.

Animais

Foram utilizados vinte ratos Wistar sexualmente maduros obtidos no departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em sala limpa com ciclo de luz / escuridão invertido de 12h em uma temperatura de 24 ± 2 ° C e temperatura controlada por umidade $55 \pm 5\%$. Todos os animais foram alojados em gaiolas e tiveram acesso a alimentos (Labina do Brasil) e água ad libitum. Ambos os grupos passaram por um período de aclimação durante duas semanas para reverter a adaptação do ciclo da luz. Vinte ratos foram divididos em 2 grupos como grupo de exposição a partículas de exaustão do diesel (GT= 10 ratos) e um grupo controle não exposto (GC = 10 ratos). O grupo exposto passou por um período de adaptação às câmaras do sistema de exposição por inalação do dia 89 aos 104 dias pós-natal. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética do

Departamento de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA / UFPE n ° 23076.012392 / 2011-32).

Sistema de exposição por inalação

Nosso sistema de exposição foi projetado para reproduzir a característica de emissão de aerossóis apresentada por nebulizadores industriais com partículas respiráveis inferiores a 5µm, conforme projetado na figura 1. Este dispositivo é composto por três partes: 1. Compressor de ar livre de óleo (PRESSURE-OP 330 linha dental-1HP) calibrado para 5psi a um caudal de 10L / min; 2. A câmara de admissão e distribuição de ar comprimido consiste em um segmento de tubo de cloreto de polivinila branco (PVC) com 100mm de diâmetro e 25cm de comprimento. Neste foram inseridas dez conexões de 9/16 polegadas para o oxigênio dispostos radialmente. Ambas as extremidades dos tubos foram seladas por dois tampões Cap brancos pra tubos de PVC a 100mm com anéis de borracha para vedação. Na tampa inferior foi inserida uma conexão de 9/16 polegadas para oxigênio, na qual a mangueira estava conectada do compressor de ar. Na tampa superior foram inseridos um manómetro de 60 psi / 4 Kgf/cm² para medir a pressão interna da câmara de admissão e distribuição de ar comprimido; 3. As câmaras exposição de acrílico individuais foram concebidas para acomodar modelos murinos com idade variando de 90 a 180 dias com volume de 10L estabelecendo um modelo de inalação de corpo completo (FORTOUL et al., 2011). A parte anterior de cada câmara de exposição foi adaptada com uma máscara nebulização de silicone para indivíduos adultos, um copo micro-nebulizador e um tubo de silicone responsável pela conexão com a câmara de distribuição de ar. Na parte de trás de cada câmara foi feito um orifício protegido com uma tela para ventilação e dispersão da umidade.

Após o final do período experimental os animais foram anestesiados, eutanasiados e os testículos e pulmões foram retirados, pesados e fixados em Bouin por 24 horas. Ambos os testículos tiveram suas túnicas albugíneas intactas, então cortados transversalmente e transferidos para etanol a 70%. Os fragmentos de testículos e pulmões foram rotineiramente processados e embebidos em parafina. Posteriormente, foram obtidas secções de 5 µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina para análise de microscopia óptica.

Avaliação da eficiência da exposição

Para verificar a eficiência da exposição e confirmar que o material particulado foi inalado, o pulmão dos animais foi analisado qualitativamente em microscópio de luz, afim de verificar a presença do material particulado nos alvéolos.

Para avaliar a eficiência da exposição por inalação às partículas da exaustão do diesel, secções do pulmão de animais expostos foram avaliados de forma qualitativa sob microscopia de luz para localização de material particulado na arquitetura pulmonar. Considerou-se a eficácia da exposição a observação de material particulado nos compartimentos de condução do ar externo, presença de material particulado nos compartimentos de troca de gases e material particulado retido no parênquima pulmonar, bem como no interior de células.

Avaliação dos parâmetros testiculares

Volume de Componentes de Tecido Testicular

As densidades de volume dos componentes testiculares foram determinadas por meio da observação em microscopia de luz e os dados morfométricos foram obtidos através da contagem de pontos por alocação sistemática aleatória de um sistema de grade- teste com 441

pontos de intersecção acoplada ao tudo da lente ocular do microscópio. Quinze campos sobre a preparação histológica do testículo foram escolhidos aleatoriamente totalizando 6,615 pontos para cada animal com uma ampliação de 400 x. O volume em microlitros de cada componente do testículo foi determinado como o produto da densidade volumétrica (%) e do volume testicular. Para cálculos estereológicos subsequentes, a densidade específica do tecido do testículo foi considerada como 1,0 (JOHNSON; NEAVES, 1981). O índice tubulossomático (ITS) foi calculado dividindo-se o volume de túbulo seminífero pelo peso corporal e em seguida multiplicado por 100 (AMANN, 1970), enquanto o índice epiteliossomático (IES) foi obtido pela divisão do volume do epitélio seminífero pelo peso corporal multiplicado por 100 (SIMAN et al., 2017).

Diâmetros Tubulares, Altura de Epitélio Seminífero e Comprimento total do túbulo seminífero

Todas as análises e medições foram efetuadas a partir da seleção aleatória de túbulos seminíferos que apresentavam, para cada animal, contornos o mais circular possível. O diâmetro tubular médio e a altura do epitélio seminífero de trinta túbulos transversais foram medidos com uma ampliação de 100X, empregando o software Image J para processamento das imagens (Processamento e Análise de Imagem em Java, v1.45s). A altura do epitélio foi obtida nos mesmos túbulos utilizados para determinar o diâmetro tubular. O diâmetro tubular e a altura do epitélio em cada túbulo foram realizados pela média de duas medidas diametralmente opostas. O comprimento total do túbulo seminífero (LST) por testículo e por grama de testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos (STV) dividido pelo quadrado do raio (R^2) do túbulo seminífero multiplicado pelo valor de (π) (JOHNSON; PETTY; NEAVES, 1981) :

Contagem de célula germinativa e de Sertoli

Todos os núcleos de células germinativas e nucléolos de células de Sertoli presentes no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero foram contados em 10 secções transversais de túbulos seminíferos. Essas contagens foram corrigidas para a espessura da seção e o núcleo ou o diâmetro do nucléolo de acordo com Abercrombie (ABERCROMBIE, 1946), conforme modificado por Amann (AMANN, 1961), para espermatídes arredondadas e células Sertoli, respectivamente. Para este fim, 10 núcleos ou nucléolos foram medidos para as espermatídes arredondadas e para as células de Sertoli por animal, respectivamente. O índice de células de sertoli (SCI) foi calculado a partir da razão entre o número corrigido desse tipo celular por secção transversal de túbulo seminífero e o número de corrigido de espermatídes arredondadas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero.

O número total de células de Sertoli foi determinado a partir das contagens corrigidas de nucléolos de células de Sertoli por seção transversal de túbulos seminíferos e do comprimento total de túbulos seminíferos anteriormente descritos (HOCHEREAU-DE REVIERS; LINCOLN, 1978). A produção espermática diária (PED), por testículo e por grama de testículo (AMANN, 1970) é o volume do túbulo seminífero multiplicado pelo número corrigido se espermatíde arredondada, dividido pela duração do ciclo multiplicado pelo área da secção transversal e multiplicada pela espessura do corte. (HOCHEREAU-DE REVIERS; LINCOLN, 1978)

Relações celulares

A eficiências do processo espermatogênico e das células de Sertoli nos animais tratados e controle, foram estimadas a partir das razões entre os números corrigidos de células

da linhagem espermatogênica e o número de células de Sertoli no estágio I do ciclo do epitélio seminífero.

As seguintes razões foram utilizadas: coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais = preleptóteno/espermatogônias; rendimento geral da espermatogênese = Espermátide arredondada/espermatogônias; índice meiótico = espermátide arredondada/espermatócitos primários em paquíteno; índice de célula de Sertoli = espermátide arredondada/Sertoli; capacidade total de suporte da célula de Sertoli = espermatogônias + espermatócitos em preleptóteno e paquíteno + espermátide arredondada/ Sertoli.

Frequências das fases do ciclo do epitélio seminífero

As fases do ciclo foram caracterizadas com base na forma e localização dos núcleos de espermátides, presença de divisões meióticas e composição geral do epitélio seminífero (DC., 1995; JOHNSON; NEAVES, 1981). Este método fornece 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero. As frequências relativas do estágio foram determinadas a partir da análise de 400 secções transversal de túbulos seminíferos por animal com uma ampliação de 400X. Ambos testículos foram analisados para cada animal. As secções histológicas utilizadas foram aquelas que apresentaram os melhores perfis em cortes transversais e melhor qualidade tubular

Análise estatística

De acordo com a normalidade da distribuição dos dados utilizou-se um teste paramétrico ou não paramétrico. Uma vez que a distribuição do conjunto de dados era considerada normal, o teste t- Student foi empregado, enquanto que nos casos em que o pré-requisito de normalidade não era atendida optou-se pela utilização do teste não paramétrico Mann-Whitney (Teste U). Todos os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão

(SD). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Utilizou-se o software SigmaStat Overview 3.1 para Windows.

RESULTADOS

A avaliação qualitativa do pulmão dos animais confirmou a presença do material particulado nos alvéolos. Diversas regiões do interstício apresentaram aglomerados de material de natureza particulada, bem como, presença de macrófagos alveolares e leucócitos. Macrófagos alveolares e intersticiais foram observados em associação com aglomerados de material de natureza particulada, tanto no interstício quanto nos espaços alveolares (Figura 1).

Animais que foram expostos às DEP por meio de inalação apresentaram menor peso corporal e testicular quando comparados aos animais controle.

O IGS, que determina o percentual de massa corpórea alocada no testículo, não foi alterado pela inalação de DEP disperso em sistema de exposição de corpo completo por meio do processo de atomização de líquidos.

Quanto a histomorfometria testicular, não houve diferença no diâmetro dos túbulos seminíferos, entretanto o diâmetro de lume aumentou e consequentemente foi observado uma redução da altura do epitélio seminífero.

Não foram observadas alterações no índice epiteliossomático entre os grupos experimentais. Já a área do lume tubular aumentou, enquanto a área de epitélio seminífero no grupo exposto às DEP foi significativamente inferior. Também não foram observadas alterações significativas na área do túbulo seminífero.

Ao estabelecer a relação túbulo epitélio (RTE) foi observado que o grupo GT apresentou um aumento dessa relação, confirmando a redução da parte funcional do túbulo, o epitélio seminífero.

A proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular descritas em percentagem mostram que não houve alterações significativas referentes aos compartimentos tubular e intertubular, enquanto o volume do túbulo seminífero reduziu e o volume do espaço intertubular não foi alterado. Além do mais o índice tubulossomático (ITS) não foi alterado nos dois grupos experimentais. Nos animais avaliados no presente estudo que foram expostos as DEP ocorreu redução no comprimento total dos túbulos seminíferos quando avaliado por testículo e por grama de testículo (Tabela 1).

O diâmetro nuclear de espermatócitos primários em paquíteno e em pré leptóteno não foram alterados pela exposição as (DEP), no entanto o diâmetro das espermátides arredondadas aumentou e o diâmetro do nucléolo da célula Sertoli reduziu (Tabela 2). O número corrigido de espermatogônias, espermatócitos primários em pré leptóteno e paquíteno não alteraram. Já Os números celulares corrigidos de espermátides arredondadas aumentaram, enquanto os números corrigidos de células Sertoli reduziram.

O índice de célula de Sertoli e a capacidade de suporte se mantiveram. O índice mitótico não se alterou, ao passo que o índice meiótico teve redução significativa no GT. Já a população estima de células de Sertoli quando calculada por testículo e por grama de testículo mostrou-se reduzida.

Na figura 2 são apresentados os resultados da quantificação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero para os dois grupos avaliados no presente estudo. Foi constatada a alteração na frequência dos estádios 2 e 6 que tiveram um aumento ao mesmo tempo que os estádios 3 e 5 tiveram sua frequência reduzida.

A alteração dos parâmetros citados anteriormente acrescida das avaliações morfométricas quantitativas do processo espermatogênico resultam em um aumento na produção espermática diária em animais expostos às PED quando avaliados por grama de testículo e apresentaram uma redução significativa da produção espermática diária quando avaliada por testículo (Tabela 3).

DISCUSSÃO

O tratamento com DEP reduziu o peso testicular sendo essa redução reflexo da redução do comprimento de túbulo seminífero assim como a redução do volume tubular reflete a redução do ITS. O peso do testículo geralmente estabelece a normalidade do testículo, alterações no peso e volume induzidas experimentalmente estão associadas ao comprometimento dos compartimentos testiculares tubular e intersticial, possibilitando alterações e potenciais efeitos da produção de espermatozoides (FRANÇA, L. R. AND RUSSELL, 1998).

Diminuição no peso do testículo reflete perda de células germinativas e diminuição da produção de fluidos (LANNING et al., 2002). A secreção reduzida e a contração tubular são efeitos observados de agentes toxicológicos sobre o testículo. Em muitos casos, esta é uma consequência secundária da perda de células germinativas, mas em outras parece ser um evento inicial e provavelmente representa distúrbios na função das células de Sertoli. Uma vez que a secreção é uma função dependente de andrógenos, os compostos que causam reduções significativas nos níveis testiculares de testosterona reduzirão a secreção de fluido tubular e o diâmetro tubular como efeito secundário (CREASY, 2001).

O IME reduziu devido a redução do número de espermatídes arredondadas. Embora tenha ocorrido redução no número de células de Sertoli a capacidade de suporte dessa célula e consequentemente rendimento da espermatogênese foram mantidas.

Exposição pré-natal, tanto em baixa 0,17 mg / m³ quanto em alta dose de 1,17 mg / m³ provocam redução na PDE devido a um número insuficiente de células de Sertoli em ratos maduros, pode-se especular que o menor número de células de Sertoli detectadas em os ratos maduros são uma consequência da diferenciação inadequada de células de Sertoli durante o período fetal (KUBO-IRIE et al., 2011).

Distúrbios em outros componentes do sistema reprodutor masculino são observados em estudos que expuseram animais em fase de vida.

Watanabe (2005) mostraram que a exposição realizada a partir do 7 dia de gestação em dose baixas 0,17 mg / m³, e alta 1,71 mg / m³ provoca redução da população PED de da população de células de Sertoli em ratos 96 dias após o nascimento. De acordo com Kubo-Irie et al. (2011) a exposição fetal de modelos murinos a baixa concentração de DEP na dose de 0,17 mg / m³ apresentou degeneração de túbulos seminíferos e redução da população de células de Sertoli, embora não haja variação na produção diária de esperma.

A exposição pré e pós-gestacional ao MP_{2,5} ambiental mostrou que não houve mudança notável na população celular de células de Leydig, células de Sertoli, espermatogonia, espermatocimetas ou espermatófitas redondas observadas entre os grupos experimentais. Não foram observadas alterações significativas na proliferação de células germinativas ou na frequência de estágios espermatogênicos (PIRES et al., 2011).

De acordo com Creasy (1997) dependendo da concentração dos agentes toxicológicos, as células de Sertoli apresentam em primeira ordem disfunções de características bioquímicas antes de qualquer evidência de morte celular. Assim, muitas irregularidades da

espermatogênese devido à interferência de bloqueadores endócrinos podem refletir mudanças na função da população de células de Sertoli e não necessariamente por patologia nas próprias células germinativas (SIKKA; WANG, 2008).

A redução no diâmetro das espermátides arredondadas do diâmetro de Células de Sertoli podem indicar morte celular, embora não tenha sido realizada análise específica, sabe-se que a morte celular pode acontecer dentro de minutos ou depois de várias horas podendo ocorrer pelas vias da necrose e da apoptose. A morte por necrose ocorre após danos severos e descontrolados em várias estruturas celulares, causando a perda do controle homeostático, o aumento do volume celular, a interrupção da função mitocondrial e o rompimento da membrana celular. Na morte por apoptose há diminuição do volume celular com a condensação nuclear e do citoplasma, causando a perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas (MCCONKEY, 1998; WILLIAMS; SMITH, 1993). Os mecanismos de morte celular não são totalmente independentes, podendo haver múltiplos mecanismos que atuem simultaneamente (ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010).

Essa possível morte celular, justificaria a perda de células germinativas e consequentemente a redução na produção espermática. Refletindo nas patologias visualizadas no grupo tratado, como descamação de epitélio, vacúolos e células no lúmen.

Os animais expostos ao DEP apresentaram alteração da frequência de estágio, podendo ser também reflexo da desorganização epitelial e perda celular, podendo ser reestabelecida caso ocorra reorganização celular (HESS et al., 1988).

Embora o processo de dispersão tenha sido feito por nebulização com sistema de ar comprimido livre de óleo, a análise da fração gasosa torna-se importante, pois durante o processo de solução de atomização e dispersão as partículas podem ter possíveis reações com o ar gerado. Além disso, as partículas usadas foram extraídas diretamente do cano de escape

do ônibus e, portanto, não apresentaram contato com o ar atmosférico. No entanto, o sistema de exposição funciona produzindo aerossóis contendo DEP com diâmetro aerodinâmico e dispersão semelhante ao processo de escape do automóvel. Estas características do sistema de exposição são semelhantes ao processo de inalação e partículas de deposição em alvéolos pulmonares.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram fortes evidências de que a exposição ao material particulado pode desencadear mudanças importantes na morfometria e estereologia de ratos adultos, causando efeitos adversos nos dados biométricos de testículos, compartimentos tubulares e parâmetros somáticos testiculares, células germinativas e célula de Sertoli, comprometendo a produção de espermatozoides.

Tabela 1. Dados biométricos e morfométricos em ratos Wistar adultos

PARÂMETROS	GC	GT
Peso corporal (g)	423.43 ± 22.50	397.43 ± 19.68*
Peso testicular(g)	1.81 ± 0.08	1.65 ± 0.11 *
Volume Testicular (ml)	3.62 ± 0.17	3.31 ± 0.23 *
Índice Gonadossomático (%)	0.86 ± 0.05	0.83 ± 0.03
Densidade volumétrica do parênquima testicular (%)		
Túbulo Seminífero (%)	92.02 ± 0.76	91.05 ± 0.91
Intertúbulo (%)	19.86 ± 29.23	20.68 ± 28.58
Diâmetro Tubular (µm)	281.66 ± 14.62	283.80 ± 5.61
Volume do Intertúbulo (ml)	0.71 ± 1.05	0.73 ± 0.96
Volume Tubular (ml)	3.34 ± 0.16	1.51 ± 0.10 *
Altura do Epitélio seminífero (µm)	94.53 ± 2.76	89.41 ± 3.58 *
Diâmetro do Lume Tubular (µm)	97.50 ± 10.31	104.99 ± 8.18 *
Comprimento total do túbulo por testículo (m)	51.88 ± 4.37	23.87 ± 2.52*
Comprimento de Túbulo por Grama de testículo (m)	14.29 ± 0.65	7.21 ± 0.33 *

Os resultados são expressos como média ± DP. G-DEP = Grupos expostos a partículas da exaustão do diesel (DEP = 10 µg). * P <0,05 em comparação com o grupo controle (teste t de estudante). C Valores correspondentes à média do peso do testículo direito e esquerdo.

Tabela 2. Diâmetro nuclear médio das células germinativas e nucleolar de célula de Sertoli de ratos Wistar adultos.

TIPO CELULAR	GC(µm)	GT(µm)
Espermatócito Pré-leptóteno /Leptóteno	10.53 ± 0.58	10.94 ± 0.83
Espermatócito I em Paquíteno	16.04 ± 1.48	15.16 ± 1.77
Espermátide arredondada	12.16 ± 0.53	13.48 ± 0.83 *
Célula de Sertoli	2.20 ± 0.10	2.05 ± 0.11 *

Os resultados são expressos como média ± DP. G-DEP = Grupos expostos a partículas da exaustão do diesel (DEP = 10 µg). Os asteriscos indicam uma diferença significativa (P≤0,05) entre os grupos G-DEP e GC usando teste t de Student.

Tabela 3. Contagens de células e razões celulares por secções transversais de túbulos seminíferos em ratos Wistar adultos

PARÂMETROS	GC	GT	
Espermatogônias	5.09 ± 0.83	4.41 ± 0.44	
Espermatócitos Leptóteno/Pré-leptóteno	55.71 ± 4.20	53.07 ± 3.05	
Espermatócitos em Paquíteno	68.37 ± 4.51	66.48 ± 2.63	
Espermátide Alongada	142.30 ± 14.12	141.24 ± 12.75	
Nº C de Espermátide arredondada	50.30 ± 6.34	56,53 ± 5.63 *	
Nº C de Célula de Sertoli	12.96 ± 1.24	11.19 ± 0.90 *	
Índice de Célula de Sertoli	3.90 ± 0.61	3.90 ± 0,30	
Nº de Sertoli por Testículo (10 ⁶)	6.46 ± 1.22	2.68 ± 2.36 *	
Nº de Sertoli por grama de testículo (10 ⁶)	1.77 ± 2.85	8.14 ± 6.58 *	
PDE por Testículo (10 ⁷)	6.29 ± 2.3	2.47 ± 0.5 *	
PDE/ por grama de testículo (10 ⁷)	1.72 ± 0.5	7.43 ± 0.4 *	Os resu

ltados são expressos como média ± DP. G-DEP = Grupos expostos a partículas da exaustão do diesel (DEP = 10 µg). Diferença não estatisticamente significativa (P> 0,05).

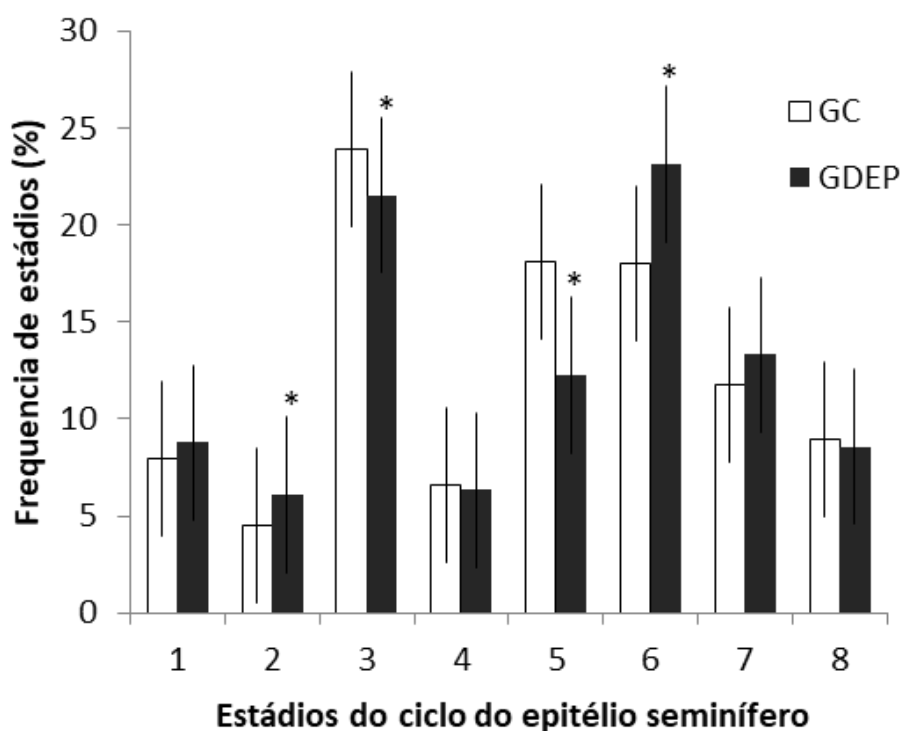


Figura 2: Frequência de estádios do ciclo do epitélio seminífero de ratos Wistar adultos do grupo exposto às DEP GT, submetido a exposição de 10 µg/mL de partículas da exaustão do diesel em solução fisiológica de NaCl (4mL) diariamente por 90 dias. Resultados expressos em Média ± Desvio Padrão. GT= grupo exposto a inalação de partículas da exaustão do diesel (DEP=10µg); GC = grupo não exposto às de partículas da exaustão do diesel (DEP=10µg). *Médias diferem entre si pelo teste t de Student.

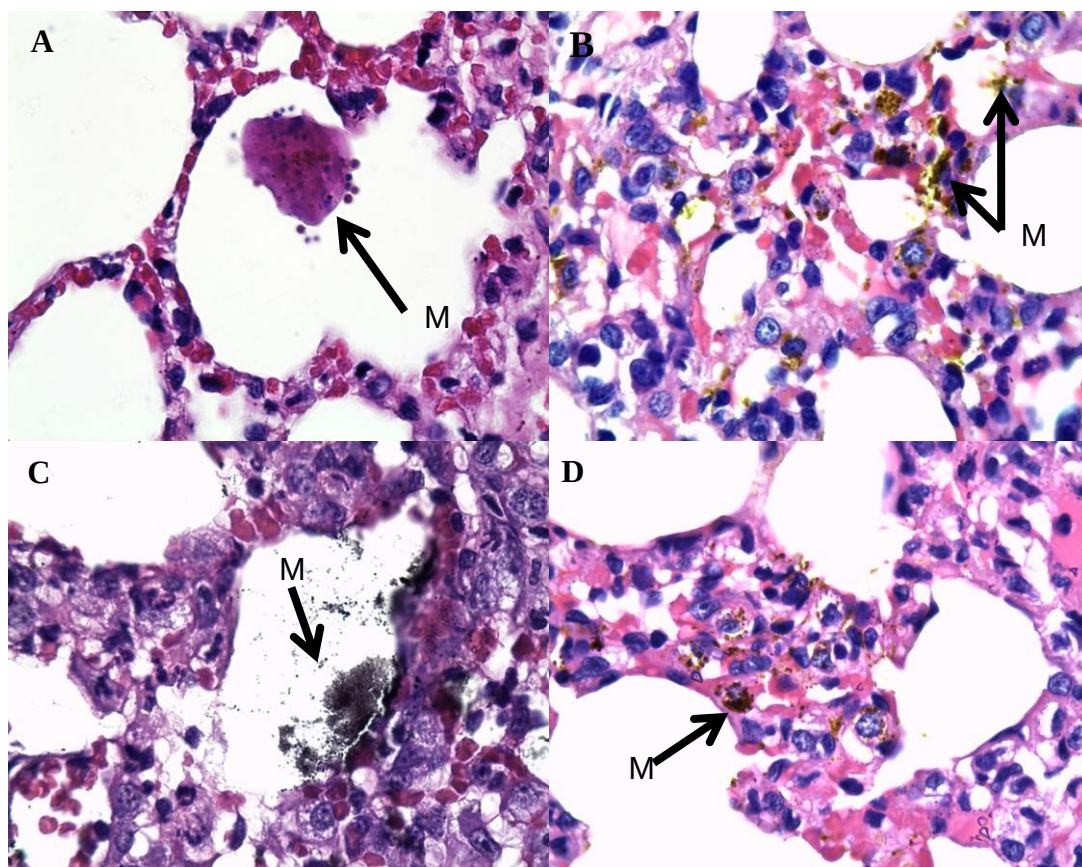


Figura 1. Fotomicrografia do parênquima pulmonar de rato Wistar adulto do grupo exposto às DEP GT, submetido a exposição de 10 μg de partículas da exaustão do diesel em solução fisiológica de NaCl (4mL) diariamente por 90 dias. Coloração HE. Barra=11 μm . A. Macrófagos intra-alveolares (M); B. DEP presente no interstício do parênquima pulmonar; C. DEP presente no interior dos alvéolos pulmonares; D. Macrófagos intersticiais (M) apresentando material particulado fagocitado.

REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **Anat**, n. 94, p. 238–248, 1946.
- ABERCROMBIE, M. NUCLEAR POPULATION FROM MICROTOME SECTIONS. **The Anatomical Record**, v. 94, n. 2, p. 239–247, 2005.
- AMANN, R. The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. **Fertil Steril**, v. 21, p. 662–672, 1970.
- AMANN, R. P. Reproductive Capacity of Dairy Bulls IV. SPERMATOGENESIS AND TESTICULAR GERM CELL DEGENERATION. **Am J Anat.**, v. 110, n. 1, p. 49–67, 1961.
- ARBEX, M. A. et al. Queima de biomassa e efeitos sobre a saúde * Biomass burning and health effects. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 2, p. 158–175, 2004.
- CARRÉ, J. et al. Does air pollution play a role in infertility?: a systematic review. **Environmental Health**, v. 16, n. 1, p. 82, 2017.
- CREASY, D. M. Review Article: Evaluation of Testicular Toxicity in Safety Evaluation Studies: The Appropriate Use of Spermatogenic Staging. **Toxicologic Pathology**, v. 25, n. 2, p. 119–131, 1997.
- CREASY, D. M. D. Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity. **Toxic Pathol**, v. 29, n. 29, p. 64–76, 2001.
- DC., B. Photographic emulsions and processing. In: STUMPF WE, S. H. (Ed.). . **Autoradiography and Correlative Imaging**. 1st ed ed. San Diego: Academic Press, 1995. p. 49–57.
- DE MIRANDA, R. M. et al. Urban air pollution: A representative survey of PM 2.5 mass concentrations in six Brazilian cities. **Air Quality, Atmosphere and Health**, v. 5, n. 1, p. 63–77, 2012.
- DEBIA, M. et al. Diesel engine exhaust exposures in two underground mines. **International Journal of Mining Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 0–4, 2017.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 40 CFR Part 50. National Ambient Air Quality Standards for Particulate Matter; Final Rule. **Federal Register**, v. 78, n. 10, p. 3086–3287, 2013.
- FORTOUL, T. I. et al. Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.
- FRANÇA, L. R. AND RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J. AND MARTINEZ-GARCIA, F. (Ed.). . **Male reproduction. A multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Livingstone, 1998. p. 197–219.
- GHIO, A. J. et al. Biologic effects of oil fly ash. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. SUPPL. 1, p. 89–94, 2002.
- HEALTH EFFECTS INSTITUTE, I. State of Global Air 2017. **Data source: Global Burden of Disease Study 2015. IHME, 2016.**, 2017.

HESS, R. A. et al. Acute effects and long-term sequelae of 1,3-dinitrobenzene on male reproduction in the rat. II. Quantitative and qualitative histopathology of the testis. **Journal of Andrology**, v. 9, n. 5, p. 327–342, 1988.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.-T.; LINCOLN, G. A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **J Reprod Fert**, v. 54, n. 1958, p. 209–213, 1978.

IARC: DIESEL ENGINE EXHAUST CARCINOGENIC. 2012.

JOHNSON, L.; NEAVES, W. B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. **Biology of Reproduction**, v. 24, p. 703–712, 1981.

JOHNSON, L.; PETTY, C. S.; NEAVES, W. B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. **Biol Reprod**, v. 25, p. 217–226, 1981.

KELLY, F. J.; FUSSELL, J. C. Air pollution and public health: emerging hazards and improved understanding of risk. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 37, n. 4, p. 631–649, 2015.

KUBO-IRIE, M. et al. Pre- and postnatal exposure to low-dose diesel exhaust impairs murine spermatogenesis. **Inhalation toxicology**, v. 23, n. 13, p. 805–13, 2011.

LANNING, L. L. et al. Recommended Approaches for the Evaluation of Testicular and Epididymal Toxicity. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 4, p. 507–520, 2002.

LEEM, J. H.; JANG, Y.-K. Increase of diesel car raises health risk in spite of recent development in engine technology. **Environmental Health and Toxicology**, v. 29, n. group 1, p. e2014009, 2014.

LICHTENFELS, A. J. F. C. et al. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 1, p. 230–232, 2007.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, v. 99, n. 3, p. 157–168, 1998.

MOHALLEM, S. V. et al. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. **Environmental Research**, v. 98, n. 2, p. 196–202, jun. 2005.

PETERS, A. et al. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 3, n. 1, p. 13, 2006.

PIRES, A. et al. Pre- and postnatal exposure to ambient levels of urban particulate matter (PM(2.5)) affects mice spermatogenesis. **Inhalation toxicology**, v. 23, n. 4, p. 237–45, 2011.

SIKKA, S. C.; WANG, R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. **Asian Journal of Andrology**, v. 10, n. 1, p. 134–145, 2008.

SIMAN, A. et al. Spermatogenic dynamics of the spiny rat *Kannabateomys amblyonyx*. **Animal Reproduction Science**, 2017.

WATANABE, N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. **Toxicology Letters**, v. 155, n. 1, p. 51–58, 2005.

WILLIAMS, G. T.; SMITH, C. A. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell

death. **Cell**, v. 74, p. 777–779, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide: global update 2005: summary of risk assessment. **Geneva: World Health Organization**, p. 1–22, 2006.

YAN, C. et al. Long-term exposure to PM_{2.5} from automobile exhaust results in reproductive dysfunction in male rats. **Zhonghua nan ke xue**, 2016.

YOSHIDA, S. et al. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 307–315, 1999.

ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Cell death mechanisms: Cross-talk and role in disease. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1374–1383, 2010.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir:

- Apesar de não afetar o peso corporal, os animais expostos as PED não apresentaram alterações de peso corporal, porém apresentam alterações no peso e volume testicular assim como no índice gonadossomático;
- As PED são capazes de alterar a densidade volumétrica dos compartimentos do testículo além do volume e diâmetro tubular, altura do epitélio e lúmen dos túbulos seminíferos;
- Não houve alteração no comprimento do túbulo seminífero por testículo, porém o comprimento do mesmo por grama de testículo aumentou nos animais expostos como resultado da diminuição do volume testicular;
- Exposições de ratos *Wistar* às PED na idade adulta não apresentam alterações na produção espermática diária nem na capacidade suporte das células de Sertoli;
- A exposição às PED durante a idade adulta por período prolongado com exposição diária curta não afetou a população de células germinativas, a população de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero, a produção espermática diária e nem a capacidade suporte das células de Sertoli;
- A possível interferência hormonal das PED alterou o diâmetro médio das espermátides arredondadas e o diâmetro nucleolar médio das células de Sertoli que são andrógeno-dependentes.
- As PED afetaram os estádios 2,3,5,e 6 do ciclo do epitélio seminífero que são dependentes de nível adequados de testosterona.
- As PED mesmo em níveis aceitáveis são capazes de afetar o sistema reprodutor de ratos machos adultos durante período prolongado de exposição.

6 PERSPECTIVAS

Ampliar área do estudo, incluindo:

- Estudo do efeito individual dos componentes orgânicos e inorgânicos na espermatogênese.
- Estudo da interferência hormonal de cada componente individual das PED.
- Estudo hitomorfométrico e ultra-estrutural das células de Leydig e células de Sertoli.
- Estudos de reversibilidade e recomposição após exposição a PED.
- Estudo epidemiológico dos efeitos da poluição atmosférica nas taxas de mortalidade na região metropolitana do Recife.

REFERÊNCIAS

- AIRE, T.A., OLOWOKO-OKORUM, M.O., QYENI, J.S. The seminiferous epithelium in the guinea fowl (*Numida meleagris*). **Cell and Tissue Research**, n.2,v.205, p. 319-325. 1980
- ALMEIDA, F.F. Estrutura e função testiculares em javalis (*Sus scrofa scrofa*) sexualmente maduros. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária): UFMG, 65p. 2002.
- AMANN, R.P. A review of anatomy and physiology of the stallion. **J.Equine Vet, Sci.**, p. 83-105, 1981a.
- AMANN, R.P., ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **J. Dairy Sci**, n.6, v. 45, p. 774-781, 1962.
- AMANN, R.P., SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. **J. Anim. Sci. Suppl**, n.2, v. 57, p. 380-403, 1983.
- BALARINI, M.K., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P., PEIXOTO, J.V., GUIÃO-LEITE, F.L., ROSSI JR, J.L., CZERMAK JR, A.C., WALKER, N.J. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775). **Theriogenology**, n.5, v. 77, p. 873–880, 2011.
- BARDIN, C.W. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Eds). The Leydig cell. Viena: **Cache River Press**, p. 31-42, 1996.
- BASCOM, K.F., OESTRUD, H.L. Quantitative studies of testicle. II. Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. **Anat. Rec**, n.2, v.31, p. 159-169, 1925.
- BELL, M.L., SAMET, J.M., DOMINICI, F. Time-series studies of particulate matter. **Annu Rev Public Health**, v. 25, p.247–80, 2004.
- BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **J. Anim Sci**, n.5, v.44, p.818-883, 1977.
- BITTENCOURT, V.L., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P., FONSECA, C.C., COSTA, D.S., BENJAMIN, L.A., COSTA, E.P. The seminiferous epithelium cycle and daily spermatoc production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyuros*, Illiger, 1811). **Micron** n.6, v.38, p. 548-589, 2007.
- BRAGA, A. Poluição atmosférica e seus efeitos na saúde humana. Disponível em: <http://www.cgu.unicamp.br/energia2020/papers/paper_saldiva.pdf>. Acesso em: 27 jun 2010.
- BROUWER, A., AHLBORG, U.G., VAN-DEN-BERG, M., BIRNBAUM, L.S., BOERSMA, E.R., BOSVELD, B., DENISON, M.S., GRAY, L.E., HAGMAR, L., HOLNE, E., et al. . Functional aspects of developmental toxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in experimental animals and human infants. **Eur J Pharmacol**, n.1, v. 293, p.1-40, 1995.
- CANADIAN ENVIRONMENTAL REPORT ACT 1999 (CEPA). Priority substances list assessment report: respirable particulate matter less than or equal to 10 microns. 1999. Disponível em: <<http://www.ec.gc.ca/>>. Acesso em fevereiro, 2011.
- CAPEL, B. The battle of sexes. **Merch. Dev**, n.1, v. 92, p. 89 -103, 2000.

- CARREAU, S., GENISEL, C., BILINSKA, B., LEVALLET, J. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. **Int. J. Androl**, n. 4, v. 22, p. 211-223, 1999.
- CHENG, C.Y., MRUK, D.D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. **Physiol. Rev**, n.4, v. 82, p. 825-74. 2002
- CHIARINI-GARCIA, H., RUSSELL, L.D. High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. **Biol. Reprod**, n.4, v.65, p.1170-78, 2001.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial review. **Physiol. Rev**, v.52, p.198- 236. 1972.
- CLERMONT, Y., LEBLOND, C.P. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the “periodic acid-Schiff” technique. **Amer J Anat**, v.96, p. 229–253. 1955
- CLUNIES, R.C., STANMORE, B.R., MILLAR, G.J. Dioxins in diesel exhaust. **Nature**, p.381:379, 1996.
- COONEY, D.J., HICKEY, A.J. The generation of diesel exhaust particle aerosols from a bulk source in an aerodynamic size range similar to atmospheric particles. **Intern. J. Nanomed**, n.4, v.3, p.435–449, 2008.
- COSTA, G.M.J., CHIARINI-GRACIA, H., MORATO, R.G., ALVARENGA, R.L.L.S., FRANÇA, L.R. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar. **Theriogenology**, n.7, v.70, p.1136-1146, 2008.
- DE ROOIJ, D.G., RUSSELL, L.D. All you wanted to know about spermatogenesis but were afraid to ask. **J Androl**, v.21, p. 776–798, 2000
- DE ROSA, M., ZARRILI, S., PAESMO, L., CARBONE, U., BOGGIA, B., PETRETTA, M., MAISTRO, A., CIMMIO, F., PUCA, G., CALAO, A., LOMBARDI, G. Traffic pollutants affect fertility in men. **Hum reprod**, n.5, v. 18, p. 1055-61, 2003.
- DYM, M. Spermatogonial stem cells of the testis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n.24, v.91, p.11298-11302, 1994.
- ELDER, A., OBERDÖRDTER, G. Translocation and effects of ultrafine particles outside of the lung. **Clin Occup Environ Med**, n.5, p.785–796, 2006.
- FAWCETT, D.W., NEAVES, W.B., FLORES, M.N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biol. Reprod**, n. 9, p. 500-532, 1973.
- FORTOUL, T.I., RODRIGUEZ-LARA, V., GONZALEZ-VILLALVA, A., ROJAS-LEMUS M., CANO-GUTIERREZ, G., USTARROZ-CANO, M., COLIN-BARENQUE, L., MONTAÑO, L.F., GARCÍA-PELEZ, I., BIZARRO-NEVARES, P., LOPEZ-VALDEZ, N., FALCON-RODRIGUEZ, C.I., JIMENEZ-MARTÍNEZ, R.S., RUIZ-GUERRERO, M.L., LÓPEZ-ZEPEDA, L.S., MORALES-RIVERO, A., MUÑIZ-RIVERA-CAMBAS, A. Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. **J Biomed Biotechnol**, 2011.
- FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG, 1991, 180p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1991.
- FRANÇA, L.R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL

REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 12, 1992, Netherlands. Proceedings of the... Hague, p.1716-1718, 1992.

FRANÇA, L.R., CARDOSO, F.M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. **Tissue Cell**, n. 3, v. 31, p. 274-280, 1999.

FRANÇA, L.R., GOSH, S., YE, SHI-JUN, RUSSEL, L.D. Surface and surface-to-volume relationships of the Sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Biol. Reprod**, v.49, p.1215-1228, 1993.

FRANCA, L.R., HESS, R.A. Structure of the Sertoli cell. In: SKINNER, M., GRISWOLD, M. (Eds). Sertoli cell Biology. San Diego - California: **Elsevier Academic Press**, p. 19-40, 2005.

FRANÇA, L.R., JACKSON, A., RUSSELL, L.D. Hormone sensitivity of germ cells in stage XIV and in stage I of the rat spermatogenic cycle. **Tiss. Cell**, n. 26, p. 375-383, 1994.

FRANÇA, L.R., OGAWA, T., AVARBOCK, M.R., BRINSTER, R.L., RUSSELL L.D. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biol Reprod**, v.59, p. 1371-1377, 1998a

FRANÇA, L.R., RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J., MARTINEZ GARCIA (Eds.). Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid: **Churchill Livingstone**, Cap. 16, p.197-219. 1998.

FRANCA, L.R.; HESS, R.A., COOKE, P.S., RUSSEL, L.D. Neonatal hypothyroidism causes delayed cell maturation in rats treated with propylthiouracil: Evidence that Sertoli cell controls testis growth. **Anat. Rec**, v. 242, p. 57-69, 1995.

FREITAS, A.M., SOLCI, M.C. Caracterização do MP₁₀ e MP_{2,5} e distribuição por tamanho de cloreto, nitrato e sulfato em atmosfera urbana e rural de Londrina. **Quim. Nova**, n. 07, v. 32, p. 1-5, 2009.

GODINHO, C.L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 80p, 1999.

GRISWOLD, M.D. Interaction between germ cells and Sertoli cells in the testis. **Biol. Reprod**, v.52, p.211-216, 1995.

GUIÃO-LEITE, F.L., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P., FONSECA, C.S., DAS NEVES, M.T., BARROS, J.B.G. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*), **Animal Reproduct Scienc**, v. 91, p.307-316, 2006.

HESS, D.R. Nebulizers: Principles and Performance. **Respir. Care**, n.45 v. 6. p.609-622, 2000.

HESS, R.A., FRANÇA, L.R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG, C.Y. (Eds.). Molecular mechanisms in spermatogenesis. Landes Bioscience, p. 1-15, 2007. (corrigir)

HUANG, J.Y., LIAO, J.W., LIU, Y.C., LU, S.Y., CHOU, C.P., CHAN, W.H., CHEN, S.U., UENG, T.H. Motorcycle exhaust induces reproductive toxicity and testicular interleukin-6 in male rats. **Toxicol Sci**, n.103, v.1, p.137- 48, 2008.

ILIO, K.Y., HESS, R.A. Structure and function of the ductile efferents: a review. **Microsc. Research. Techn**, v.29, p. 432-467, 1994.

- IZAWA, H., KOHARA, M., WATANABE, G., TAYA, K., SAGAI, M. Diesel exhaust particle toxicity on spermatogenesis in the mouse is a aryl hydrocarbon receptor dependent. **J. Reproduct dev**, n.53 p.1069-78, 2007.
- JOHNSON, L., VARNER, D.D., ROBERTS, M.E. et al. . Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Anim. Reprod Sci**, v. 60-61, p.471-480, 2000.
- KARL, J., CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. In: Developmental biology. **Academic Press**, v.203, p.323-333. 1998..
- KITTELSON, D.B. Engines and nanoparticles: A review. **J. Aerosol. Sci**, n.5–6, v.29, p.575–88, 1998.
- KOIVISTO, P., ADLER, I.D., PACCHIEROTTI, F., PELTONEN, K. DNA adducts in mouse testis and lung after inhalation exposure to 1,3- butadiene. **Mutat Res**, v.397 p.3-10, 1998.
- LEBLOND, C.P., CLERMONT, Y. Definition of the stages of the seminiferous epithelium in the rat. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v.55, p.548-573, 1952.
- LI, N., SIOUTAS, C., CHO, A., SCHMITZ, D., MISRA, C., SEMPFF, J. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. **Environ Health Perspect**, n.4, v.111, p.455–460, 2003.
- LICHTENFELS, A.J., GOMES, J.B., PIERI, P.C., EL-KHOURI-MIRAGLIA, S.G., HALLAK, J., SALDIVA, P.H. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. **Fertil Steril**, n.1, v.87, p.230-2, 2007.
- MAISONET, M., CORREA, A., MISRA, D., JAAKKOLA, J.J.K. A review of the literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth. **Environ Res**, v.95, p.106 –15, 2004.
- MEHTA, R., KUMAR, T. Traffic pollutants affecting male fertility. **Human Reproduction**, n.9 v.18, 1981.
- MENDIS – HANDAGAMA, S.M., ARIYARATNE, H.B. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. **Biol reproduct**, n.3, v. 65, p. 660-71, 2001.
- MINGUILLÓN, M. C., ARHAMI, M., SCHAUER, J. J., SIOUTAS, C. **Atmos. Environ**, v.42, p. 7317, 2008.
- MIRANDA, J.R. Efeitos do tratamento neonatal com 6-N-Propil-2-Tiouracil (PTU) e FSH na proliferação das células de Sertoli e função testicular em ratos Wistar adultos. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) - UFMG, 75p., 2002.
- MIRANDA, R.M., ANDRADE, M.F., FORNARO, A., ASTOLFO, R., ANDRE, P.A., SALDIVA, P. Urban air pollution: a representative survey of PM_{2.5} mass concentrations in six Brazilian cities. **Air Qual Atmos and Health**, n.1, v.5, p.63-77, 2011.
- MOHALLEM, S.V., LOBO, D.J.A., PESQUERO, C.R., ASSUNÇÃO, J.V., ANDRÉ, P.A., SALDIVA PHN DOLLNIKOF, M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of São Paulo. **Environ Res**, n.2 v.98 p.196-202, 2005.
- NEVES, E.S., CHIARINI-GARCIA, H., FRANÇA, L.R. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. **Biology of Reproduction**, n.1, v.67, p. 247-255, 2002.
- NIKULA, K.J., SNIPES, M.B., BARR, E.B. Comparative pulmonary toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats. **Toxicol. Sci**. n.1, v.25, p.80–94, 1995.

ONO, N., OSHIO, S., NIWATA, Y., YOSHIDA, S., TSUKUE, N., SUGAWARA, I., TAKANO, H., TAKEDA, K. Detrimental effects of prenatal exposure to filtered diesel exhaust on mouse spermatogenesis. **Arch Toxicol**, v.82, p.851–859, 2008

ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **Anato. Rec**, n.4 v.203, p.485-492, 1982.

ORTH, J.M., GUNSALUS, G.L., LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, n.3, v.122, p.787-794, 1988.

PAULA, T.A.R., CHIARINI-GARCIA, H., FRANÇA, L.R. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrocoerus hydrochaeris*). **Tiss. Cell**, n.3, v.31, p.327-334, 1999.

PELLINIEMI, L.J., KUOPIO, T., FROJDMAN, K. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Eds). The Leydig Cell. Ed. Cache River Press. Vienna. 143-157. 1996.

PEREIRA, L.F.F. Temas em revisão: Bases para a escolha adequada dos dispositivos inalatórios. **Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, p.1- 30, 2007.

PIRES, A., DE MELO, E.N., MAUAD, T., NASCIMENTO SALDIVA, P.H., DE SIQUEIRA BUENO, H.M.. Pre-and postnatal exposure to ambient levels of urban particulate matter (PM_{2.5}) affects mice spermatogenesis. **Inhalation Toxicology**, v.232, p.37-245, 2011.

PLANT, T.M., MARSHALL, G.R. The Functional Significance of FSH in Spermatogenesis and the Control of Its Secretion in Male Primates. **Endocrine rev**, n.6, v.22, p.764-786, 2001.

POPE, C. A. 3rd., BATES, D. V., RAIZENNE, M. E. Health effects of particulate air pollution: time for reassessment? **Environmental Health Perspectives**, n.5, v.103, p. 472-480, 1995.

POPE, C.A., BURNETT, R.T., THUN, M.J. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. **JAMA**, n.9,v.287, p.1132–1141, 2002.

RITZ, C., RUMINSKI, W., HOUGAARD, K.S., WALLIN, H., VOGEL, U., YAUK, C.L. Germline mutation rates in mice following in utero exposure to diesel exhaust particles by maternal

inhalation. **Mutat Res**, n.1-2, v.712, p.55-58, 2011.

ROCHA, D.C.M., DEBELJUK, L., FRANÇA, L.R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. **Tiss. Cell**, n.3, v.31, p.372-379, 1999.

ROOSEN-RUNGE, E.C. The process of spermatogenesis in mammals. **Cambridge: University Press**, 214p, 1977.

ROOSEN-RUNGE, E.C; GIESEL Jr, L.O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. **Am. J. Anat.** n.1, v.87, p.1-30. 1950.

RUSSELL, L.D. Mammalian Leydig cell Structure. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSEL, L.D. (eds). The Leydig Cell. Vienna, IL: Cache river Press, Rec., n. 3, v.187, p. 347-366, 1977.

RUSSELL, LD; ETTLIN, RA; SINHA-HIKIM, AP; CLEGG, ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press. 1990.

RUSSELL, L.D., ETTLIN, R.A., SINHA-HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press, 1990a.

RUSSELL, L. D., REN, H. P., SINHA- HIKIM, I., SCHULZE, W., SINHA-HIKIM, A. P. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. **Amer. J. Anat**, n.1,v. 188, p.21-30, 1990b.

RUSSELL, L.D., CORBIN, T.J., BORG, K.E., et al. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. **Endocrinology**, n.5, v. 133, p.2062-2070. 1993.

RUSSELL, L.D; SINHA-HIKIM, AP; GHOSH, S. et al. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: BARTKE, A (Eds). Function of somatic cells in the testis. New York: Springer-Verlag. 1994.

RYU, B.Y. ORWIG, K.E. OATLEY, J.M. AVARBOCK, M.R. BRINSTER, R.L. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. **Stem Cells**, n.6, v. 24, 1505–1511, 2006.

SAGAI, M., ICHINOSE, T., FURUYAMA, A. Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). III. Pathogenesis of asthma-like symptoms in mice. **Free Radic. Biol. Med**, n.2, v.21 p. 199–209, 1996.

SALDIVA, P. H. N., KING, M., DELMONTE, V.L.C., MACCHIONE, M., PARADA, M.A.C., DALIBERTO, M.L., SAKAE, R.S., CRIADO, P.M.P., PARADA, P.L.P., ZIN, W.A., BÖHM, G.M. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats, **Environ Res**, n.1, v.57, p.19-33, 1992.

SCHLATT, S., MEINHARDT, A. AND NIESCHLAG, E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. **Eur J. Endocrinol**, n.1, v.137, p.107-117, 1997.

SCHULZ, H., MUHLE, H. Respiration. In: KRINKE, GJ, (Ed). The laboratory rat. 1ed. cap,16. p, 323-447, 2000.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (Ed.). Reproduction in Domestic Animals. San Diego: Academic Press, 1991, p.221-249.

SHARPE, RM. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E; NEIL, JD. (Eds). The physiology of reproduction. New York: Raven Press. p.1363-1434. 1994.

SILVA JUNIOR, V.A., FRANÇA, L.R. Leydig cell ultrastructure and steroidogenesis in different species of mammals. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, n.3, v. 3, p. 117-134, 2000.

SINHA-HIKIM, A.P., AMADOR, A.G., KLEMCKE, H.G. et al. . Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testis in active and inactive states of spermatogenesis. **Endocrinology**, n.4, v.125, p.1829-1843, 1989.

U.S. EPA. Health Assessment Document for Diesel Engine Exhaust. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Center for Environmental Assessment, Washington Office, Washington, DC, EPA/600/8-90/057F, 2002. Disponível em: <<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recorddisplay.cfm?deid=29060>> acesso em: 30 de jun de 2010.

UNEP. Ultraviolet radiation. Environmental Health Criteria. 160. United Nations Environment Programme, World Health Organization, International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Geneva: WHO; 1994.

VASCONCELOS, G.S.C. Ciclo do epitélio seminífero de quati (*Nasua nasua* Linnaeus, 1776). Dissertação (Livre docência) – Departamento de veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 59p

WATANABE, N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. **Toxicol Lett**, n.1, v.155, p.51-8, 2005.

WATANABE, N., OONUKI, Y. Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats. **Environ Health Perspect**, n.7, v.107, p.539-44, 1999.

WHO (World Health Organization) [Internet]. 2005. Air quality guidelines global updates 2005. Disponível em http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair_aqg/en/

WHO (World Health Organization) [Internet]. 2005. Air quality guidelines, global update 2005: particular matter, ozone, nitrogen dioxide, and sulphur dioxide. Germany; Cap. 10, p. 217-305.

WING, T.Y., CHRISTENSEN, A.K. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. **Am. J. Anat**, n.1,v.165, p.13-25, 1982.

YE, S.J., YING, L., GHOSH, S. et al. Sertoli cell cycle: a re-examination of the structural changes during the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. **Anat. Rec**, n.2, v.237, p.187-98, 1993.

YOSHIDA, S., SAGAI, M., OSHIO, S., UMEDA, T., IHARA, T., SUGAMATA, M., SUGAWARA, I., TAKEDA, K. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. **Int J Androl**, n.5, v.22, p.307-15. 1999.

ANEXOS

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and editorial policy](#)
- [Form and preparation of manuscripts](#)
- [Send of the manuscripts](#)

Scope and editorial policy

Arquivos do Instituto Biológico aims to publish in Portuguese, English or Spanish original high quality scientific articles, which contribute significantly to the development of the Agricultural Sciences, in the field of animal and vegetal sanity, related to agribusiness and its implication in the agri-environment, including quality and food safety. It is also accepted papers on urban pests. The journal supports and follows the principles and standards recommended by COPE (Committee on Publication Ethics), an international organization reference on integrity and ethics in scientific publishing. Thus, the entire process, selection criteria and journal publication follow the conduct rules and ethics in accordance with http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf.

A cover letter should come along with the manuscript describing the importance of the work in the field, qualifying it for publication in **Arquivos do Instituto Biológico**. In addition, a statement signed by the corresponding author on behalf of all authors, must be attached as a supplementary document in the designated area in the online system where the authors state that: a) the data contained in the manuscript is original and authentic, so there is no fraud and/or plagiarism derivations (all received manuscripts are subjected to a software to detect plagiarism); b) the manuscript was not submitted for publication in any other printed or electronic vehicle; c) the manuscript content is authors' responsibility, who assume they have contributed significantly to research and must provide retractions or correct mistakes if necessary. In case of doubt, see the [Singapore Statement](#); d) in case of conflicts of interest, they will be manifesting, which will subsequently be examined by the Editorial Committee.

Additional information:
Studies involving: 1- animal experimentation and/or genetically modified organisms must be approved by the Ethics and Biosafety Committee, mentioning the process number in the paper and a copy of the approval provided by the correspondent responsible Committee of the author's home institution must be forwarded; 2- plants must have the prior registration and deposit of this material (vouchers) in registered collections and accessible to the public, with the

inclusion of its identification number on the manuscript. 3-DNA sequences must have the accession number in enabled databases informed in the manuscript.

The manuscripts submitted to **Arquivos do Instituto Biológico** are preliminarily analysed by the Editorial Committee. During the pre-analysis, the Committee checks if it fits in the scope and merit for publication. The manuscripts that do not match the editorial requirements or that need to be redrafted will be rejected without a review. The preselected manuscripts will be submitted to critical analysis of at least 2 Scientific Consultants (ad hoc) chosen by specialists in the field of the submitted article. The Scientific Consultant also fills an evaluation form. The acceptance of the article is in agreement with the Editor-in-chief of the Editorial Committee. In case the article is rejected by part of the Scientific Consultants, the Associate-Editor will issue his conclusive technical opinion. The reviews and the conclusive technical opinion will be forwarded to the authors for corrections, justifications and presentation of the new version of the draft, which is compared to the original version by the Editor-in-chief of the Editorial Committee. Once it is accepted, the article is forwarded to reference, abstract and vernacular review. After the layout change, the text is submitted to final corrections by the authors and by the Editorial Committee. All articles are published following the approval order.

The fare for publication in the journal **Arquivos do Instituto Biológico** is R\$ 60,00 (sixty Brazilian reais) per diagrammed page.

After the work is accepted, as communicated by the editor-in-chief, the authors must deposit the total amount of this fee to the account Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio - FUNDEPAG (CNPJ 50.276.237/0001-78) [Banco do Brasil (001), bank branch 4328-1, bank account 30.200-7 or Banco Santander (033), bank branch 0637, bank account 13-001316-9]. A copy of the proof of deposit must be sent by fax or e-mail, mentioning the work's publication ID number, to: +(55-11) 5087-1790 or
Email: arquivos@biologico.sp.gov.br

Form and preparation of manuscripts

To be considered for publication, the work must be either a scientific article or scientific communication, although the Editorial Committee will also accept review articles, at its discretion.

Scientific article: consists of the following items: title, name(s) of the author(s), address of the corresponding author and place of origin of the other authors, abstract, keywords, translated title, translated abstract, translated

keywords, followed by the introduction, materials and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments and references.

Scientific communication: consists of the following items: title, name(s) of the author(s), address of the corresponding author and place of origin of the other authors, abstract, keywords, translated title, translated abstract, translated keywords, followed by the text without subdivisions, acknowledgments and references. Scientific publication is a brief report, its publication is immediate as this is an relevant original fact but its content is insufficient for a scientific article.

Review article: consists of the following items: title, name(s) of the author(s), address of the corresponding author and place of origin of the other authors, abstract, keywords, translated title, translated abstract, translated keywords, followed by the text without subdivisions, and references.

Presentation: the works must be submitted in Microsoft WORD format (.doc or .docx), page-size A4, margins 2.5 cm, size 12 Times New Roman font, double spaced, with continuous page numbering using the Layout tool in the Page Setup or Page Layout menu item. The maximum number of pages is 25 for review articles, 20 for scientific articles and 10 for scientific communications, including tables and figures.

Language: the work can be written in Portuguese, English or Spanish. When written in Portuguese, the translated title, abstract and keywords will be in English. When written in English or Spanish, the translated title, abstract and keywords will be in Portuguese.

Title: although brief, the title should tell precisely what the article is about, focusing on its main purpose.

Name (s) and Address (es) of the author(s): should not be included in the manuscript body because *Arquivos do Instituto Biológico* uses double blind peer review. This information should be inserted in the specific field of the online submission system.

Abstract: should concisely present the aim of the work, the materials and methods and conclusions, in a single paragraph. The length must not exceed 300 words.

Keywords: under the abstract and separated by a space, provide at most five keywords separated by commas. Avoid terms that appear in the title.

Translation of title, abstract and keywords: works in Portuguese must provide a translation of the title, abstract and keywords in English. Works in English or Spanish must

provide a translation of the title, abstract and keywords in Portuguese. The length of the abstract must not exceed 250 words.

Introduction: describe the nature and the purpose of the work, its relation with other research studies in the context of existing knowledge, along with the reason why the present study was carried out.

Material and methods: present a description that is brief yet sufficient to allow for the repetition of the work. Previously published techniques and processes, except when modified, should be merely cited. Scientific names of species and of drugs should be cited in accordance with international standards.

Results: accompanied by tables and/or figures when necessary. The tables and figures should be inserted after the references.

Discussion: discuss the results obtained, comparing them with those of other published works (results and discussion may be combined within a single section).

Tables and figures: include a clear and concise title that allows the table or figure to be understood without consulting the text. The tables should not contain vertical lines. In the text, use the abbreviated word (e.g.: Fig. 3). The figures must be in the format jpg (photos) or gif (graphics and diagrams), of a size less than 500 Kb. The original or higher-definition figures will be requested after the submission is approved for publication. These should be sent in individual files and named according to the number of the figure, for example Fig1.gif, Fig2.jpg.

Conclusions: presented in their order of importance. They can be given in a separate section or as part of the discussion.

Acknowledgments: these may refer to people and/or institutions. In case of funding agency, the financing process number must be included.

References and citations in the text: the citations in the text and references are directly linked. It is recommended around 25 references to articles and scientific communications. All of the authors cited should be included in the references. The citation of authors should be presented in the format of author's last name and the year of the publication, and should be in small caps, for example: one author Allan (1979) or (Allan, 1979); two authors – Lopes; Macedo (1982) or (Lopes; Macedo, 1982); more than two authors – Besse et al. (1990) or (Besse et al., 1990); coincidences of authors or year of publication – (Curi, 1998a), (Curi, 1998b) or (Curi, 1998a, 1998b). The references should

be formatted according to NBR 6023/2002, of the Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), and be in alphabetical order by first author, as in the examples in the following link:

The following examples will serve as a guideline for the formatting and presentation of references:

a) Periodical article

ANDRÉA, M.M. ; PETTINELLII JÚNIOR, A. Efeito de aplicações de pesticidas sobre a biomassa e a respiração de microrganismos de solos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.67, n.2, p.223-228, 2000.

b) Article in periodical published on Internet

FELÍCIO, J.D.; SANTOS, R. da S.; GONÇALES, E. Componentes químicos de *Vitis vinifera* (Vitaceae). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.68, n.1, p.47-50, 2001. Disponível em: <http://www.biologico.br/arquivos/v68_1/9>. Acesso em: 5 mar. 2002.

c) Dissertations and Theses

PERES, T.B. *Efeito da aplicação de pesticidas na atividade microbiológica do solo e na dissipação do 14C-Paration Metílico*. 2000. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2000.

SIMONI, I.C. *Utilização de diferentes linhagens celulares para propagação do vírus da doença infecciosa da bursa*. 2001. 77f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular - Área de Microbiologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

d) Dissertation/Thesis published on Internet

BATISTA, A.S. *Saccharomices cerevisiae* em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxicoses. 2001. 96p. Dissertação (Mestrado - Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em: 28 jun. 2005.

e) Entire books, brochures, etc.

BECKMANN, N. (Ed.). *Carbon-13 NMR spectroscopy of biological systems*. San Diego: Academic Press, 1995. 334p.

f) Part of a book (chapter, passage, fragment, etc.)

Chapter or part without specific authorship – author of the part is the same author as the overall work

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: _____. *Molecular biology of the cell*. 3th.ed. New York: Garland Publications, 1994. 1294p. Chap. 19.

Part with specific authorship

BANIJAMALI, A. Thyroid function and thyroid drugs. In: FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. (Eds). *Principles of medicinal chemistry*. 4th. Ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 1995. chap.30, p.688-704.

Send of the manuscripts

The original should be submitted only in electronic form at the address <https://mc04.manuscriptcentral.com/aib-scielo>.

[[Home](#)] [[About the journal](#)] [[Editorial board](#)] [[Subscription](#)]



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](#)

Instituto Biológico
Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252
Vila Mariana - São Paulo - SP - CEP: 04014-002
Tel.: (11) 5087.1749
Fax:(11) 5087.1790



arquivos@biologico.sp.gov.br